

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

Aus der Sektion für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen
der Universitätsmedizin Rostock

Leiter: Prof. Dr. med. Holger S. Willenberg

**Transdifferenzierung von Nebennierenrindenzellen in Abhängigkeit von ihren
physiologischen Stimuli und Sekretionsprodukten**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universität Rostock

Vorgelegt von
Felix Friedrich, geb. 11.08.1994 in Zwickau
aus Rostock

Rostock, den 01.07.2021

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003061

- Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, MBA
Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten
Universitätsmedizin Rostock
Dekan der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
1. Gutachter / Betreuer: Prof. Dr. med. univ. Holger S. Willenberg
Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen
Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: PD. Dr. rer. nat. Thomas Bittorf
Institut für Medizinische Biochemie
Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. univ. Martin Fassnacht
Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen
Universitätsklinikum Würzburg

Datum der Abgabe: 31.07.2020

Datum der Verteidigung: 21.04.2021

Diese Arbeit wurde auf folgenden Tagungen vorgestellt:

13. JADE-Meeting

07. - 08.12.2018

Würzburg

14. Deutsche Nebennierenkonferenz

01. - 02.02.2020

Leipzig

63. Deutscher Kongress für Endokrinologie

04. - 06.03.2020

Gießen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock in folgender Publikation veröffentlicht:

Friedrich F, Mueller K, Bruch PG, Hakenberg OW, Bastian M, Almanson S, Willenberg HS. Flow-dependent differentiation of cultured adrenal cells under different stimuli. Cell Tissue Res. 2021 May;384(2):325-331.

Ich danke für die Unterstützung und Motivation:

Michaela

meinen Eltern

Matthias

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
1 Einleitung	8
1.1 Anatomie und grundlegende Funktionen der Nebenniere	8
1.2 Regulation der Funktion der Nebenniere	9
1.2.1 Die Regulation der Steroidbiosynthese durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse	9
1.2.2 Weitere Aspekte der Regulation von Nebennierenfunktionen	10
1.3 Die Entwicklung der Nebenniere	11
1.4 Die Hypothese von Hornsby und Dringenberg	15
1.4.1 Die Theorie der Zellmigration und die Idee eines Morphogengradienten.....	15
1.4.2 Molekulare Aspekte der Nebennierendifferenzierung	19
1.5 Ziel der Arbeit	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Zellkultur	25
2.1.1 Die NCI-H295R-Zelllinie	25
2.1.2 Die Kultivierung von NCI-H295R-Zellen	25
2.1.3 Die Kultivierung von HUVEC-Zellen	26
2.1.4 Die Herstellung von endothelzellkonditioniertem Medium	27
2.2 Die Stimulation der NCI-H295R-Zellen	27
2.2.1 Der theoretische Aufbau des Gradienten in der Zellkultur.....	27
2.2.2 Die praktische Umsetzung des Aufbaus eines Konzentrationsgradienten in Zellkultur	28
2.3 Molekularbiologische Methoden	30
2.3.1 RNA-Extraktion	30
2.3.2 Photometrische Bestimmung der Ribonukleinsäurekonzentration	31
2.3.3 Komplementäre DNA-Synthese	32
2.3.4 Realtime quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion	32
2.4 Datenauswertung	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Einfluss der in Zellkultur erzeugten Morphogengradienten auf die relative Genexpression des Melanocortin-2-Rezeptors	36
3.2 Einfluss der in Zellkultur erzeugten Morphogengradienten auf die relative Genexpression des Angiotensin-II-Rezeptors Typ1	38
3.3 Einfluss der in Zellkultur erzeugten Morphogengradienten auf die relative Genexpression der Aldosteronsynthese	40

3.4	Einfluss der in Zellkultur erzeugten Morphogengradienten auf die relative Genexpression der 11 β -Hydroxylase	42
3.5	Einfluss der in Zellkultur erzeugten Morphogengradienten auf die relative Genexpression der 17 α -Hydroxylase und der 17,20-Lyase.....	44
4	Diskussion	46
5	Anhang	55
5.1	Ergänzende Graphen	55
5.2	Material	56
5.2.1	Chemikalien und Fertiglösungen	56
5.2.2	Kits.....	56
5.2.3	Verbrauchsmaterialien.....	57
5.2.4	Geräte.....	57
5.2.5	Software	58
6	Literaturverzeichnis	59
7	Abbildungsverzeichnis	69
9	Abkürzungsverzeichnis	71
10	Eidesstattliche Erklärung	73
11	Lebenslauf	74
12	Thesen	75

Zusammenfassung

Bis heute ist nicht abschließend geklärt, wie die Gliederung der Nebennierenrinde (NNR) in die bekannten drei Zonen (*Zona glomerulosa*, *Zona fasciculata*, *Zona reticularis*) zustande kommt. Die Theorie von Hornsby und Dringenberg bietet einen Erklärungsansatz für diese Frage. Grundlage der Hypothese ist die Vermutung, dass sich die Zonierung durch den Konzentrationsgradienten eines Stoffes ergibt, welcher sich entlang des Blutflusses vom subkapsulären Plexus zum Mark der Nebenniere aufbaut. Dringenberg fand Beweise, dass sich aufgrund der kontinuierlichen Sekretion von Glucocorticoiden durch sämtliche Zellen der NNR ein solcher Gradient in der Nebenniere ergibt, welcher die Zonierung erklären könnte. So wird durch die steigende Konzentration von Glucocorticoiden im Blut der NNR zunehmend die Expression des Angiotensin-II-Rezeptor Typ1 und der Aldosteronsynthase, welche charakteristisch für die *Zona glomerulosa* sind, gehemmt. Dies führt zu einer Enthemmung des Signalweges des ACTH-Rezeptors und ermöglicht die ACTH-abhängige Cortisolsekretion in der *Zona fasciculata*. Da gemäß dieser Hypothese der gerichtete Blutfluss in der NNR von entscheidender Bedeutung für die Zonierung ist, entwickelte unsere Arbeitsgruppe eine Versuchsanordnung, mit der man einen Blutfluss in Zellkultur simulieren kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten humanen Nebennierenrindenzellen der NCI-H295R-Zelllinie Stoffe sezernieren, welche die Funktion benachbarter Zellen beeinflussen. Durch den kontinuierlichen Fluss des Kulturmediums in der Zellkulturflasche kam es zu einer signifikanten Veränderung der Genexpression der Zellen in Abhängigkeit von ihrer Position in der Zellkulturflasche.

Des Weiteren konnten wir darlegen, dass durch die Zuleitung von glucocorticoidhaltigem Zellkulturmedium die Expression des Angiotensin-II-Rezeptor Typ1 gehemmt und die der 11 β -Hydroxylase erhöht wurde, wie Dringenberg es postuliert hatte.

Darüber hinaus gelang uns der Nachweis, dass durch die kontinuierliche Zufuhr von endothelzellkonditioniertem Medium (ECCM) die Zellen in Abhängigkeit ihrer Position in der Zellkulturflasche vermehrt CYP11B2 exprimierten. Zusätzlich wurde durch die Verwendung von ECCM die Expression von CYP11B1 reduziert.

Insgesamt zeigten unsere Experimente, dass ein gerichteter Fluss von Zellkulturmedium einen Gradienten erzeugen konnte, der wiederum eine positionsabhängige Veränderung der Genexpression der verwendeten Zellen bewirkte. Auch unterstreichen die Ergebnisse die Bedeutung von Glucocorticoiden bei der Zonierung der NNR. Dabei wird jedoch deutlich, dass ein Zusammenspiel verschiedener Gradienten, welche jeweils unterschiedlich ausgerichtet sind, wahrscheinlich ist. Dies bestätigt nicht die Vermutung Dringenbergs, der davon ausging, dass alleinig der Cortisolgradient die Zonierung der NNR reguliert. Auch Hornsby hingegen sprach in seiner Veröffentlichung von dem Gradienten „eines“ Morphogens.

1 Einleitung

1.1 Anatomie und grundlegende Funktionen der Nebenniere

Die Nebennieren befinden sich jeweils am apikalen Pol der rechten und linken Niere. Beide Nebennieren lassen sich grundsätzlich in zwei Anteile gliedern: die Nebennierenrinde und das Nebennierenmark [1]. Das Mark besteht aus Katecholamin-bildenden, chromaffinen Zellen, welche in Gruppen und Nestern angeordnet sind.

Die Rinde, welche die Hauptmasse des Organs ausmacht, umgibt das Mark und lässt sich weiter morphologisch und funktionell in drei Zonen einteilen (Abb. 1.1). An die Organkapsel angrenzend befindet sich die *Zona glomerulosa* (zG), eine schmale Schicht, deren Zellen relativ klein und in Nestern angeordnet sind. Sie sezerniert vor allem Mineralcorticoide, deren wichtigster Vertreter das Aldosteron darstellt. An die zG schließt sich der größte Teil der NNR, die *Zona fasciculata* (zF), an. Die Zellen dieser Zone sind in Strängen angeordnet, zwischen denen Sinusoide verlaufen. In der zG werden überwiegend Glucocorticoide, vor allem Cortisol, sezerniert. In direkter Nachbarschaft zum Nebennierenrindenmark befindet sich die *Zona reticularis* (zR), deren Zellen in netzartig verzweigten Strängen angeordnet sind [2]. Die zR sezerniert vor allem Androgenvorstufen, aber auch kleinere Mengen Glucocorticoide.

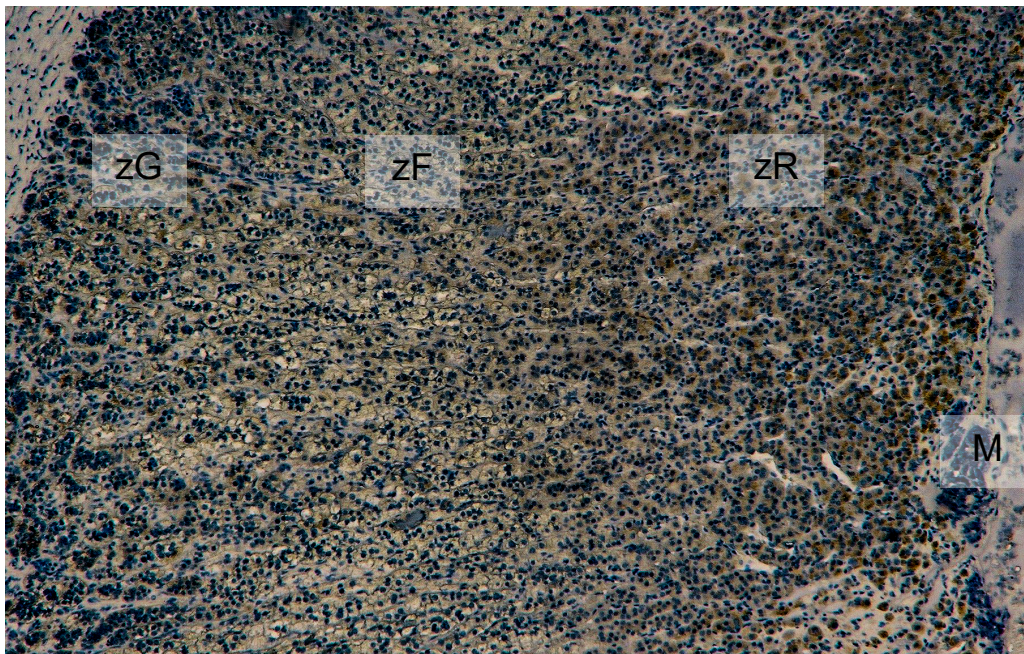


Abb. 1.1: Histologie der Nebenniere. Die Nebennierenrinde lässt sich in drei Zonen einteilen, welche sich sowohl funktionell als auch histologisch unterscheiden: *Zona glomerulosa* (zG), *Zona fasciculata* (zF), *Zona reticularis* (zR). Die Nebennierenrinde umgibt das Nebennierenmark (M). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von H. S. Willenberg.

1.2 Regulation der Funktion der Nebenniere

1.2.1 Die Regulation der Steroidbiosynthese durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse

Die von der Nebennierenrinde gebildeten Hormone haben weitreichende Bedeutung im menschlichen Organismus. Mineralcorticoide greifen maßgeblich in den Wasser- und Salzhaushalt ein. Sie bewirken die simultane Natrium-Rückresorption und Kaliumsekretion im distalen Tubulus der Niere, was zu einer Wasserretention und nachfolgendend zu einer Blutdruckerhöhung führt. Die Sekretion von Mineralcorticoiden steht vorrangig unter dem Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), sowie des adrenocorticotropen Hormones (ACTH) und monovalenten Kationen [1]. Sinkt der Blutdruck, kommt es aufgrund reduzierter Wanddehnung der *Vasa afferentia* und über die Sympathikus-vermittelte Aktivierung von β_1 -Rezeptoren zur Ausschüttung von Renin, welches Angiotensinogen zu Angiotensin I spaltet. Angiotensin I wird durch das *Angiotensin-converting Enzyme* (ACE) in Angiotensin II (ATII) umgewandelt. ATII wirkt auf vielfältiger Weise, unter anderem fördert es die Aldosteronfreisetzung, wirkt vasokonstriktorisch und induziert die Zellproliferation der zG [3, 4]. Erhöht sich der Blutdruck durch die Wirkung von ATII und Aldosteron, wird die Ausschüttung von Renin wiederum gehemmt.

Glucocorticoide haben unter anderem Einfluss auf den Glukosestoffwechsel, die Immunregulation und den Knochenstoffwechsel. Ihre Biosynthese wird primär über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse gesteuert. Hypothalamische Neurone, vorrangig die des *Nucleus arcuatus*, projizieren in die *Eminentia mediana* im Bereich des oberen Infundibulums der Hypophyse und sezernieren dort Releasing-Hormone. Ein wichtiges *Releasing-Hormon* ist das *Corticotropin-Releasing-Hormon* (CRH), welches die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormones (ACTH) im Hypophysenvorderlappen bewirkt. Außerdem aktiviert CRH das sympathische Nervensystem und es wird vermutet, dass CRH auch einen direkten Einfluss auf die adrenocorticale Steroidbiosynthese hat [5]. ACTH seinerseits bewirkt vor allem eine Steigerung der Glucocorticoidsynthese, insbesondere des Cortisols. Über eine negative Rückkopplung hemmt Cortisol die Freisetzung von CRH im Hypothalamus.

Die von den Zellen der zR synthetisierten und sezernierten Androgene sind kaum biologisch wirksam [2]. Sie dienen jedoch als Hormonvorläufer, welche erst in verschiedenen anderen Geweben, wie beispielsweise Hoden, Ovar, Prostata oder Plazenta zu Testosteron oder Estrogenen umgewandelt werden. Während beim Mann die adrenalen Androgene quantitativ eine untergeordnete Rolle spielen, stellen sie bei der Frau dagegen den Hauptanteil der zirkulierenden Androgene dar. Die Androgen-Sekretion der NNR kann zwar durch hohe ACTH-Spiegel gesteigert werden, doch sind die Regulationsmechanismen im Grunde unklar [2].

1.2.2 Weitere Aspekte der Regulation von Nebennierenfunktionen

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse und das RAAS-System sind nicht die einzigen Regulationsmechanismen, welche die Steroidbiosynthese steuern. Die Zellen der Nebennierenrinde produzieren ein breites Spektrum an Neuropeptiden, Hormonen, Neurotransmittern und Zytokinen, die in relevanter Weise die adrenale Funktion beeinflussen [6]. Es besteht außerdem eine Interaktion zwischen Nebennierenmark und Rinde. So ist das Vorkommen chromaffiner Zellen der Medulla nicht auf das Nebennierenmark beschränkt, stattdessen liegen diese Zellen einzeln, zum Teil aber auch in Nestern im gesamten Kortex verstreut [7]. Die Zellen des Cortex und die verstreuten medullären Zellen sind nicht durch Gewebe oder Interstitium voneinander getrennt [8, 9], sodass parakrin sezernierte Stoffe aus den chromaffinen Zellen die umliegenden Zellen beeinflussen können [10]. Zu den Sekretionsprodukten der chromaffinen Zellen zählen neben den Enkephalinen [11], die Substanz P [12], das vasoaktive-intestinale-Peptid (VIP) [13] und auch das Somatostatin [14]. Diese Substanzen wirken meist stimulierend auf die Steroidbiosynthese. Beispielsweise steigert VIP sowohl die Aldosteron- als auch die Cortisolsynthese [15]. Des Weiteren ist bekannt, dass die Nebennierenrinde intensiv afferent innerviert wird und direkter Kontakt zwischen Nervenendigungen und adrenocorticalen Zellen besteht [16]. Zudem enden postganglionäre Neurone der Medulla in der NNR, sodass auch den Katecholaminen eine regulatorische Funktion zukommt [17-20].

Zusätzlich spielen auch Sekretionsprodukte des Endothels eine wichtige Rolle bei der Regulation der Nebennierenrindenfunktion. Die Nebenniere ist stark vaskularisiert und wird im Verhältnis zu ihrer Größe außerordentlich gut durchblutet. Endothelzellen stellen daher einen großen Anteil des Nebennierengewebes dar. Demnach kann angenommen werden, dass auch die Sekretionsprodukte der Endothelzellen Einfluss auf die Steroidbiosynthese nehmen. Dieser Zusammenhang ist schon seit längerer Zeit Gegenstand der Forschung. Verschiedenen Forschungsgruppen gelang der Nachweis, dass endothelzellkonditioniertes-Medium (ECCM) sowohl die basale als auch die ATII-induzierte-Aldosteronsekretion fördert [21-26]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Endothelin 1 und Endothelin 3 die Steroidsekretion der zG und der zF steigern [27]. Darüber hinaus scheinen Endotheline auch das Wachstum der zG zu stimulieren [28].

Wie bereits angedeutet regulieren auch Zytokine die adrenalen Funktionen. In der Nebenniere stammen die Zytokine vor allem aus zwei Quellen: zum einem aus den Makrophagen, welche in der Rinde auch unter physiologischen Bedingungen in großer Zahl vorliegen [29, 30]. Zum anderen stammen sie aus den adrenalen Zellen selbst [31, 32]. Beide Quellen sezernieren insbesondere Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) [32, 33]. Die einzelnen Zytokine wirken in unterschiedlicher Weise auf die Steroidbiosynthese. So steigert IL-6 sowohl die Cortisol als auch die Aldosteron- und die

DHEA-Produktion [34, 35]. IL-1 dagegen zeigt vor allem einen stimulatorischen Effekt auf die Glucocorticoidbiosynthese [36, 37] und einen inhibitorischen Effekt auf die ATII-induzierte Aldosteronsynthese [38, 39].

Darüber hinaus wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass die Nebenniere selbst in der Lage ist, sowohl ACTH [40-42] als auch CRH [43, 44] zu produzieren. Die CRH-Sekretion aus adrenalen Zellen wurde bei physiologischen Stimuli beobachtet, wie beispielsweise durch: Hämorrhagie [45], die Stimulation vegetativer Nerven [46], Vasopressin [47], Neuropeptide K und IL-1 β [48, 49]. Auch ist weithin bekannt, dass neben dem „klassischen“ RAAS-System, bei dem Renin blutdruckabhängig aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere sezerniert wird (1.1.1), in verschiedenen Geweben lokale RAAS-Systeme existieren [50]. So produzieren und sezernieren die Zellen der Nebenniere sowohl Renin [51, 52], als auch Angiotensinogen [53] und Angiotensin II [54, 55]. ATII des adrenalen RAAS wird genau wie das renale ATII als Antwort auf physiologische Stimuli produziert und parakrin bzw. autokrin sezerniert [6]. Interessanterweise ist das adrenale RAAS außerdem Gegenstand aktueller Forschung hinsichtlich seiner Rolle bei Hyperaldosteronismus [56, 57].

1.3 Die Entwicklung der Nebenniere

In ihrer embryologischen Entwicklung geht die Nebenniere aus zwei Vorläuferzelltypen hervor: aus dem Zölomepithel (Mesoderm) entsteht die Rinde, während das Mark aus den Sympathikoblasten hervorgeht, die aus der Neuralleiste (Neuroektoderm) einwandern. In der 3. bis 4. Schwangerschaftswoche (SSW) kann man bereits eine Kondensation des Zölomepithels in den medialen Anteilen der Urogenitalleiste nachweisen.

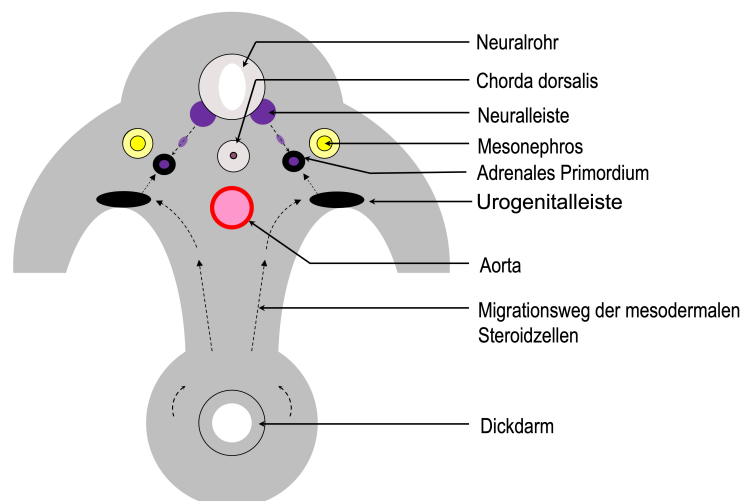


Abb. 1.2: Ursprung der Nebennierenanlage. In der 3. bis 4. SSW kommt es zur Kondensation des Zölomepithels im medialen Anteil der Urogenitalleiste. Diese Zellen migrieren in die Nähe der Nierenanlage (Urnniere, Mesonephros) und bilden das andrenale Primodium. In die Nebennierenanlage wandern chromaffine Zellen aus der Neuralleiste ein, welche später das Nebennierenmark bilden. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von H. S. Willenberg.

Diese mesodermalen Zellen migrieren, proliferieren und bilden das Adrenale Primordium. In der 8. bis 10. Woche differenziert sich das adrenale Primordium zunächst in zwei Zonen: die außen liegende „definitive“ und die innen liegende „fetale“ Zone [58]. Kurz darauf wandern bereits chromaffine Zellen aus der Neuralleiste in die Anlange ein, wo sie sich verstreut als kleine Inseln anordnen (Abb. 1.2) [58, 59]. Ultrastrukturelle Studien konnten zeigen, dass sich zwischen der fetalen und definitiven Zone eine dritte sogenannte Übergangszone entwickelt [60]. Diese Zone besitzt wahrscheinlich die Fähigkeit Cortisol zu produzieren [58].

Welche Funktion den jeweiligen Zonen in der pränatalen Entwicklung zukommt, kann anhand des Expressionsmusters der Enzyme, welche für die Steroidbiosynthese notwendig sind, abgeleitet werden. In Abbildung 1.3 ist der Ablauf der Steroidbiosynthese mit den entscheidenden Enzymen schematisch dargestellt. Wird beispielsweise die 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (HSD3B2) vermehrt und die 17α -Hydroxylase (CYP17A1) vermindert exprimiert, wird die Steroidbiosynthese in Richtung Mineralcorticoide (Funktion der zG) geleitet.

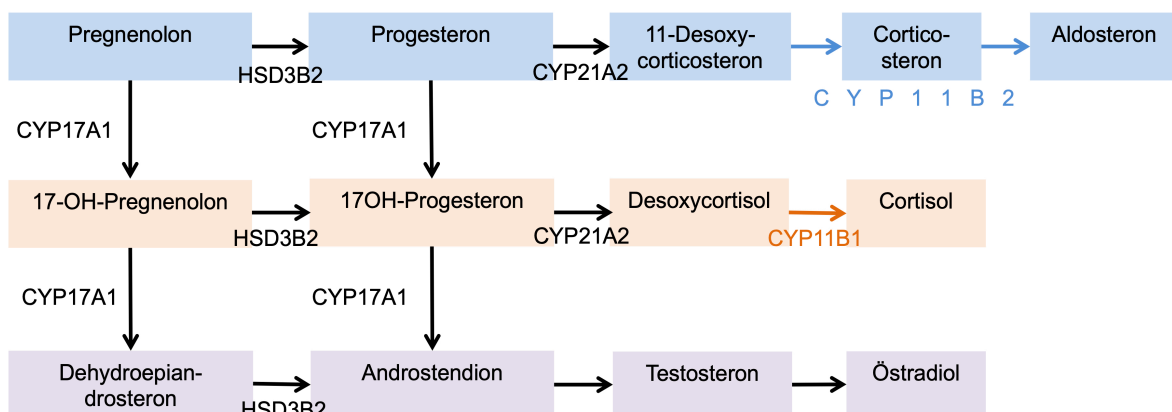


Abb. 1.3: Schema der Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde. Aus dem Expressionsmuster verschiedener Enzyme der Steroidbiosynthese, welche überwiegend zu der Familie der Cytochrome P450 (CYP) zählen, lässt sich die Funktion adrenaler Zellen ableiten. Wird die 17α -Hydroxylase (CYP17A1) vermehrt exprimiert wird die Steroidbiosynthese in Richtung Glucocorticoide bzw. Androgene geleitet. Wird CYP17A1 weniger stark und die 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (HSD3B2) vermehrt exprimiert, deutet dies auf eine erhöhte Produktion von Mineralcorticoiden hin. CYP11B1 und CYP11B2 sind Isoenzyme. Während CYP11B1 lediglich 11β -Hydroxylase-Aktivität besitzt, katalysiert CYP11B2 die letzten zwei Schritte der Aldosteronsynthese und hat dabei drei Aktivitäten: 11β -Hydroxylase, 18β -Hydroxylase und 18β -Methyloxidase. CYP11B1 und CYP11B2 können als Indikator verwendet werden, ob eine Zelle mehr Aldosteron (zG) oder mehr Cortisol (zF) produziert. Die 21α -Hydroxylase (CYP21A2) katalysiert einen wichtigen Schritt in der Biosynthese von Mineral- und Glucocorticoiden, welcher jedoch nicht in der Biosynthese von Androgenen vorkommt.

Eine vermehrte Expression der 17 α -Hydroxylase und eine verminderte Expression der 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2 leitet die Steroidbiosynthese in Richtung Androgene.

Ab der 22. SSW lässt sich die Expression der HSD3B2 in den äußersten Schichten der definitiven Zone nachweisen [61]. Die Expression der HSD3B2 breitet sich dann in die inneren Schichten des Kortex aus und ab der 28. SSW kann man sie in der gesamten definitiven Zone und in der Übergangszone nachweisen (Abb. 1.4), was die Zonen befähigt sowohl Glucocorticoide, als auch Mineralcorticoide zu synthetisieren.

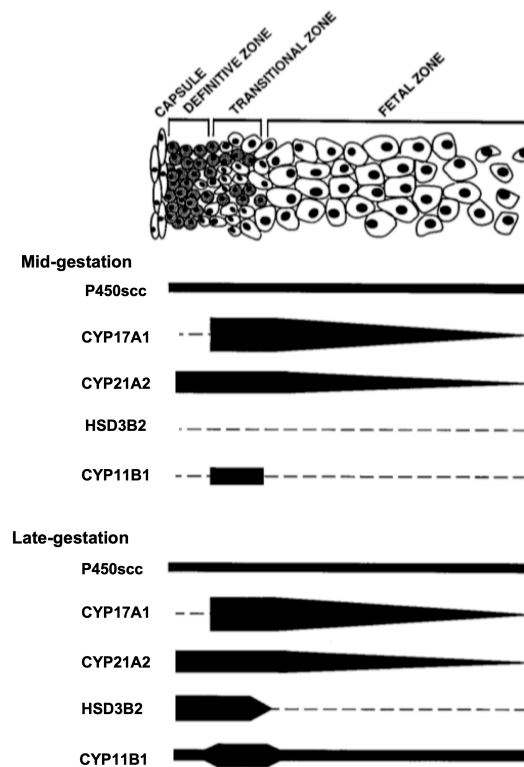


Abb. 1.4: Lokalisation der Expression von P450scc, CYP17A1, CYP21A2, HSD3B2, CYP11B1 im Verlauf der Schwangerschaft. Die Expression der Cholesterindesmolase (P450scc), welche die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon katalysiert, lässt sich zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft und in allen Zonen feststellen. Die 17 α -Hydroxylase (CYP17A1) wird am stärksten in der Übergangszone und der fetalen Zone exprimiert, was darauf hindeutet, dass diese Zonen Glucocorticoide und Androgene produzieren (Abb. 1.3). Die 21-Hydroxylase (CYP21A2) wird zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft und in allen Schichten des Cortex exprimiert. Zu keinem Zeitpunkt der Schwangerschaft wird die 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD3B2) in der fetalen Zone exprimiert. Woraus man schlussfolgern kann, dass keine Umwandlung von DHEA in weitere Androgene in der Nebenniere erfolgt (Abb. 1.3). In der späten Schwangerschaft lässt sich die 11 β -Hydroxylase (CYP11B1) in der definitiven und Übergangszone nachweisen, ein Zeichen dafür, dass bereits Cortisol und Aldosteron in diesen Zonen produziert werden (vgl. Abb. 1.3). Abbildung nach Mesiano *et al.*, 1997 [58].

In der fetalen Zone wird die HSD3B2 zu keinem Zeitpunkt der Schwangerschaft exprimiert, sodass hier vor allem Androgene synthetisiert werden [62].

Die 21-Hydroxylase (CYP21A2), ebenfalls essentiell für die Synthese von Mineral- und Glucocorticoiden, wird zu jeder Zeit der Schwangerschaft und in allen Schichten des Kortex exprimiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in der definitiven Zone eine Expression der 17 α -Hydroxylase, welche die Steroidbiosynthese weg von Mineralcorticoiden leitet, zu keinem Zeitpunkt der Schwangerschaft nachweisbar ist [63-65]. Darüber hinaus lässt sich in der definitiven Zone und in der Übergangszone ab der späten Schwangerschaft die Expression der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1/CYP11B2) feststellen [66] (Abb. 1.4).

Die definitive Zone verfügt daher über das Expressionsmuster, welche typisch ist für die zG, also für die Synthese von Mineralcorticoiden: keine Expression von CYP17A1, bei Expression von HSD3B2, CYP21A2 und CYP11B1. Sie besteht jedoch lediglich aus einer dünnen Schicht basophiler Zellen und dient zunächst wahrscheinlich nur als Stammzellreservoir für die fetale Zone [67], denn es lässt sich ein deutlicher Unterschied in der mitotischen Aktivität zwischen den beiden Zonen feststellen. So findet sich eine hohe Zahl an Mitosefiguren in der definitiven Zone und nur eine sehr geringe Zahl in der fetalen Zone. [68].

Es wurde beobachtet, dass CYP17A1 am stärksten in der Übergangszone und in der fetalen Zone exprimiert wird. Die Übergangszone besitzt daher die Enzymausstattung, welche typisch ist für die zF, also für die Synthese von Glucocorticoiden: Expression von CYP17A1, HSD3B2, CYP21A2, CYP11B1. Doch erst in der 30. SSW beginnen die definitive Zone und die Übergangszone, die Funktion der zG und zF anzunehmen [69].

Die fetale Zone zeigt das Expressionsmuster für die Synthese von Androgenvorstufen: keine Expression der HSD3B2, bei Expression von CYP17A1 [58]. Sie stellt zunächst den Hauptanteil der Nebennierenrindenanlage dar und besteht aus basophilen Zellen, die ein hohes Maß an Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S) produzieren, welches wiederum in der Plazenta in Östrogenen umgewandelt wird. Obwohl in der fetalen Zone die HSD3B2 nicht exprimiert wird, sezerniert die fetale Zone Cortisol, welches eine wichtige Rolle für die Reifung von Organsystemen spielt, insbesondere der Lungen und der Leber, sowie der Schilddrüse [58].

Nach der Geburt kommt es zu Remodellierung der Nebennierenrinde. Dabei bildet sich die fetale Zone zurück und die bereits existierenden zG und zF expandieren. Da es keinen Hinweis auf eine perinatale adrenale Insuffizienz gibt, lässt sich schlussfolgern, dass die zG und zF bereits vor der Geburt funktionstüchtig sind [58]. Die Rückbildung der fetalen Zone bewirkt zunächst einen drastischen Rückgang der DHEA-Produktion. Erst im Alter von sechs bis sieben Jahren entwickelt sich die zR, was eine Sekretion von DHEA nach sich zieht. Aus bisher noch nicht abschließend geklärten Gründen erfolgt im höheren Alter eine erneute Involution der zR. Es bleibt noch zu klären, welche Funktion dem DHEA der zR zukommt [70].

1.4 Die Hypothese von Hornsby und Dringenberg

Es wird deutlich, dass die Morphologie und die Funktion der Nebennierenrinde sehr gut beschrieben sind. Auch liegen weitreichende Erkenntnisse zur Regulation ihrer Funktion vor. Bislang konnte jedoch nicht das Zusammenspiel der genannten Akteure hinreichend erklärt werden. Daher bleibt die Frage, wie die Gliederung in die drei Zonen zustande kommt, unbeantwortet. Die Hypothese von Peter J. Hornsby und Till Dringenberg unternimmt den Versuch eine Antwort zu geben. Dabei gehen Hornsby und Dringenberg davon aus, dass in den drei Schichten der Nebennierenrinde nicht drei verschiedene Zelltypen vorliegen, sondern dass es sich um drei verschiedene Funktionszustände des gleichen Zelltyps handelt. Der Konzentrationsgradient eines Morphogens gibt den Zellen dabei eine Information über ihre Position und damit über die einzunehmende Funktion [71, 72].

1.4.1 Die Theorie der Zellmigration und die Idee eines Morphogengradienten

Viele wissenschaftliche Untersuchungen der vergangenen Jahrzehnte deuten darauf hin, dass die Stamm- bzw. Vorläuferzellen zur Zellerneuerung der NNR zunächst unter der Kapsel liegen, zentripetal in Richtung Mark wandern und dabei verschiedene Funktionszustände einnehmen. So fand man Mitte des vorigen Jahrhunderts heraus, dass sich die Nebenniere nach Eukleation, also nach der Entfernung des Marks und der Rinde unter Beibehaltung der Kapsel, wieder erholt [73, 74]. Außerdem ist bekannt, dass die subkapsuläre Zellschicht der Nebennierenrinde einen höheren Proliferationsindex aufweist [58, 75]. Auch ultrastrukturelle Studien weisen darauf hin, dass die Stammzellen zur Erneuerung des adrenalen Kortex supkapsulär liegen [76]. Bereits 1986 gelang Zajicek et al. mit Hilfe eines Thymidin-Incorporations-Assays der Nachweis dass sich die Stammzellen direkt unter der Kapsel befinden und sich diese zentripetal in Richtung Mark bewegen [77]. Dafür wurde Ratten zu einem bestimmten Zeitpunkt radioaktiv markiertes Thymidin gespritzt. Nach unterschiedlich lang definierten Lebenszeiten erfolgte ihre Tötung und eine Lokalisationsbestimmung der markierten Zellen innerhalb der NNR. Je länger die Lebensdauer der Tiere war, desto weiter waren die markierten Zellen in Richtung Mark gewandert. Dies konnte mit Hilfe eines *Genetic-Lineage-Fate-Mapping*-Modell bestätigt werden [78].

Die Theorie der Zellmigration war ein wichtiger Baustein für J. Hornsby bei der Bildung seiner Hypothese. Einen weiteren Baustein erbrachte die Begutachtung des anatomischen Aufbaus der Nebennierendurchblutung: Eine der drei *Aa. Suprarenales* versorgt den subkapsulär gelegenen Gefäßplexus, von dem aus radiär sinusoide Kapillaren durch die Rinde in Richtung Mark verlaufen. Dort sammelt sich in den Markvenen das Blut und verlässt anschließend das Organ über die *V. suprarenalis* (Abb. 1.5).

Die Theorie der Zellmigration und die Anordnung der Blutgefäße in der Nebennierenrinde ließen Hornsby vermuten, dass ein Morphogengradient existieren muss, der die

Differenzierung reguliert [71]. Demnach soll sich ein Morphogen, welches von einer Quelle (dem sog. Organisator) kontinuierlich produziert wird, in das umliegende Gewebe ausbreiten. Da die Konzentration des Morphogens mit zunehmendem Abstand von dem Organisator abfällt, wird ein Konzentrationsgradient aufgebaut. Die Zellen reagieren bei unterschiedlichen Schwellenwertkonzentrationen und damit in verschiedener Entfernung von der Signalquelle, in unterschiedlicher Weise. Beispielsweise erfolgt eine Aktivierung spezifischer Gene, wenn eine bestimmte Konzentration überschritten wird (Abb. 1.6). Die Konzentration des Morphogens an einer beliebigen Stelle des Organs ist den Zellen also ein Maß für die Entfernung von der Signalquelle und gibt ihnen damit eine Positionsinformation, wodurch ein geordnetes räumliches Muster von unterschiedlich differenzierten Zellen entsteht [79].

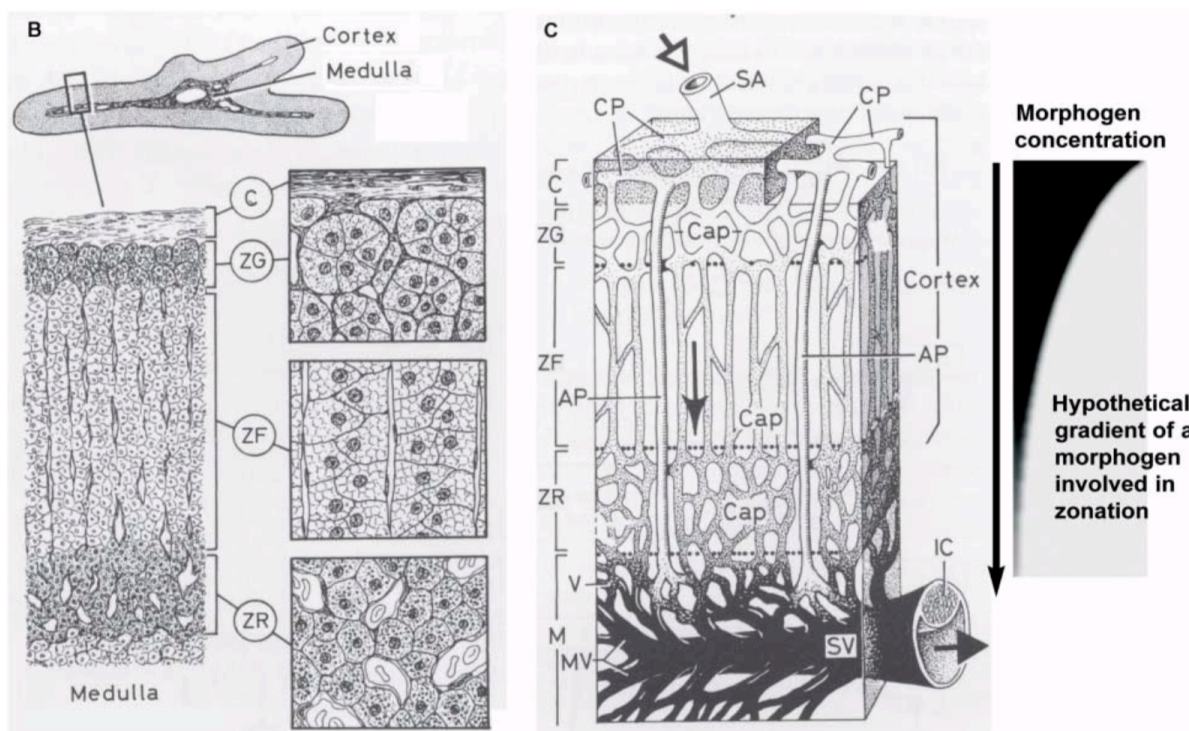


Abb. 1.5: Graphisches Modell der Nebenniere. (B) Zeichnung der makroskopischen und mikroskopischen Differenzierung (Organkapsel, C; Zona glomerulosa, zG; Zona fasciculata, zF; Zona reticularis, zR) (C) Anordnung der Blutgefäße innerhalb der Nebenniere: Aa. Suprarenales (SA) versorgen den unter der Kapsel (C) liegenden Gefäßplexus (CP), von dem aus sinusoide Kapillaren (Cap) radiär in Richtung Mark (M) verlaufen. Das Blut sammelt sich in den Markvenen (MV) und verlässt die Nebenniere über die V. suprarenalis (SV). Rechts daneben ein Modell wie der Gradient eines Morphogens angeordnet sein könnte: Das Morphogen wird von einer subkapsulär gelegenen Quelle produziert und diffundiert in Richtung Medulla (M). Dabei nimmt die Konzentration des Morphogens in Abhängigkeit von der Entfernung zur Quelle ab. In den jeweiligen Zonen (zG, zF, zR) herrschen unterschiedliche Konzentrationen des Morphogens, die den Zellen anzeigen, in welcher Zone sie sich befinden. Weitere Abkürzungen: medullary artery, AP; capillaries, Cap; veins, V; medullary veins, MV; adrenal vein, SV; smooth muscle in the wall of the adrenal vein, IC. Abbildung aus Hornsby PJ, 2012 [71].

Das Prinzip eines Morphogengradienten und dessen Möglichkeit, geordnete räumliche Muster in einem Gewebe zu erschaffen, ist in der Natur weit verbreitet und kann beispielsweise auch bei den Zellen des Colons beobachtet werden. So differenzieren sich die Stammzellen am Boden der Krypten des Colons unter dem Einfluss eines Morphogengradienten, während sie in Richtung des Cololumens wandern [80].

Interessanterweise lässt sich auch in der Nebenniere der Gradient eines Stoffes nachweisen, der in der Lage ist die Funktion der adrenalen Zellen zu beeinflussen. Dabei handelt es sich um das Hormon Cortisol. Jedoch verläuft der Gradient genau gespiegelt zu dem den Hornsby beschreibt. Im peripheren venösen Blut liegt die Konzentration von Cortisol bei ca. 10-15 µg/dl, dies entspricht auch ungefähr der Konzentration im arteriellen Blut. In Proben von Nebennierenvenenkathetern erreicht Cortisol jedoch eine Konzentration von 600-2000 µg/dl [72] (Abb. 1.7). Um zu verstehen inwiefern dieser Gradient die funktionelle Zonierung beeinflusst, müssen die molekularen Mechanismen der Steroidbiosynthese näher betrachtet werden.

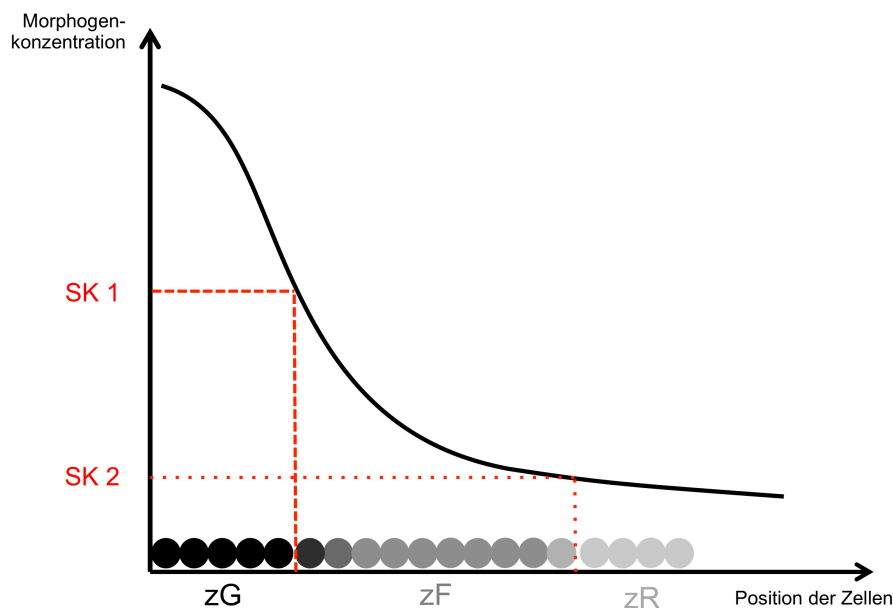


Abb. 1.6: Graphik des Morphogengradienten nach der Hypothese von J. Hornsby. Die Konzentration des Morphogens ist in unmittelbarer Nähe zum Organisator am höchsten. Das Morphogen diffundiert in das Gewebe, wodurch seine Konzentration mit zunehmendem Abstand von der Quelle abnimmt. Wird die Schwellenkonzentration 1 (SK1) unterschritten, kommt es in den Zellen z.B. zur Enthemmung von zuvor inhibierten Signalwegen, wodurch sich die Expression verschiedener Gene verändert. Eine Unterschreitung der Schwellenkonzentration 2 (SK2) bewirkt weitere Veränderungen in der Expression von Genen oder in der Regulation von Enzymen. Weitere Abkürzungen: *Zona glomerulosa*, zG; *Zona fasciculata*, zF; *Zona reticularis*, zR.

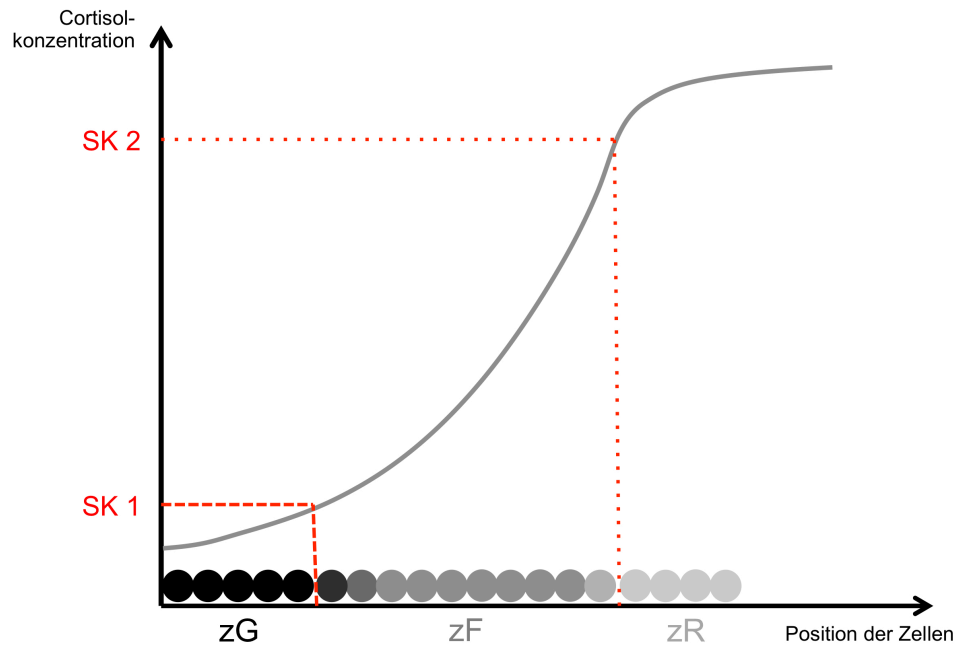


Abb. 1.7: Graphik des Glucocorticoidgradienten, wie er in der Nebenniere vorliegt. Bereits die Zellen der *Zona glomerulosa* (zG) sezernieren Glucocorticoide. Durch den Blutfluss werden diese in Richtung der *Zona reticularis* (zR) geleitet. Dabei steigt die Konzentration stetig an, bis sie die Schwellenkonzentration 1 (SK1) erreicht wird. Dadurch kommt es zu einer Veränderung der Funktion der Zellen. Die Zellen der *Zona fasciculata* (zF) produzieren mehrheitlich Cortisol, sodass die Konzentration weiter ansteigt, bis sie die Schwellenkonzentration 2 (SK2) erreicht. Dies hat zur Folge, dass sich abermals die Funktion der Zellen ändert.

1.4.2 Molekulare Aspekte der Nebennierendifferenzierung

Wie im Abschnitt 1.3.1 beschrieben, wird die Steroidbiosynthese der Nebennierenrinde im Wesentlichen von der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System kontrolliert.

In der Nebenniere bindet ACTH an den Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R). Dieser ist Gs-Protein-gekoppelt und kommt in jeder Zone der NNR in ähnlicher Dichte vor [81, 82]. Durch die Bindung von ACTH erfolgt eine Aktivierung der Adenylatzyklase, welche wiederum die Synthese des zweiten Botenstoffes (*second messenger*) 3'5'-cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP) bewirkt. Das cAMP aktiviert die Proteinkinase A, welche den Transkriptionsfaktor *Steroidogenic factor 1* (SF1) hochreguliert und andere Transkriptionsfaktoren, wie *Activator-Transcription-Factor 2* (ATF2), *Cyclic-AMP-Response Element-Binding-Protein* (CREB) und den *Cyclic-AMP-Response-Element-Modulator* (CREM) durch Phosphorylierung aktiviert.

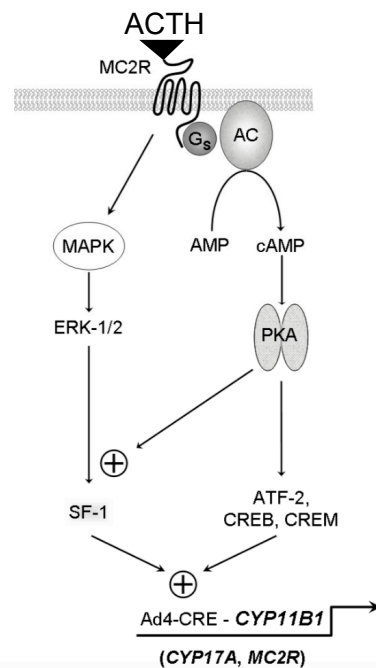


Abb. 1.8: Signalweg des Melanocortin-2-Rezeptors. Bindet ACTH in der Nebenniere an den Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R), kommt es zur Aktivierung eines stimulatorischen G-Proteins (Gs). Die Adenylatzyklase (AC) katalysiert die Umwandlung von Adenosinmonophosphat (AMP) zu 3'5'-cyclo-AMP (cAMP), welches wieder die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die PKA reguliert daraufhin verschiedene Transkriptionsfaktoren hoch bzw. aktiviert sie diese durch Phosphorylierung: *Steroidogenic-Factor 1* (SF1), *Activator-Transcription-Factor 2* (ATF2), *Cyclic-AMP-Response-Element-Modulator* (CRE), *Cyclic-AMP-Response-Element-Binding-Protein* (CREB). Dadurch kommt es zur Expression der ACTH-Zielgene: der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1), der 17 α -Hydroxylase (CYP17A1) und des MC2R. Diese drei Zielgene verfügen über ein gemeinsames Promotorelement: die Region Ad4 (AAG-GCT/CC), an die der SF1 bindet. Weitere Abkürzungen: *Mitogen-Activated-Protein Kinases* (MAPK), *Extracellular-Signal-Regulated-Kinases 1/2* (ERK-1/2). Abbildung aus Dringenberg et al., 2013 [72].

Diese Signalkaskade aktiviert die Expression der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1), der 17 α -Hydroxylase (CYP17A1) [83, 84] und des Melanocortin-2-Rezeptors [85] (Abb. 1.8). Die Steroidbiosynthese wird also in Richtung Glucocorticoide, speziell Cortisol geleitet (Abb.1.3). Die Wirkung von Angiotensin II (ATII) auf die Steroidbiosynthese wird durch den Signalweg des Angiotensin-II-Rezeptor Typ1 (AT1R) vermittelt (Abb.1.9). Der AT1R wird am stärksten in der *Zona glomerulosa* exprimiert [86] und ist entweder an ein inhibitorisches G-Protein (kurz Gi-Protein) oder an die Phospholipase C β gekoppelt [87].

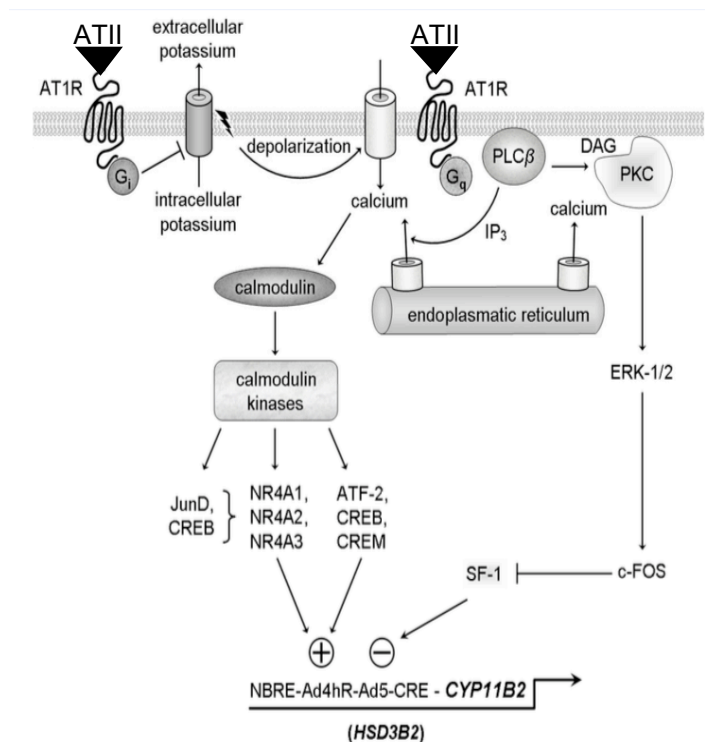


Abb. 1.9: Signalweg des Angiotensin-II-Rezeptors Typ1. Angiotensin II (ATII) bindet in der Nebennierenrinde an den Angiotensin-II-Rezeptor Typ1 (AT1R), welcher entweder mit einem inhibitorischen G Protein (kurz Gi Protein) oder an die Phospholipase C β (PLC β) gekoppelt ist. Wird das Gi-Protein aktiviert, hemmt dieses den Kaliumkanal KSNJ5, wodurch es zu einer Membrandepolarisation und somit zu einem Calciumeinstrom kommt. Wird die PLC β aktiviert erfolgt die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), diese regt die Expression der *Extracellular-Activated-Kinases 1/2* (ERK1/2) an, welche die den Transkriptionsfaktor c-Fos phosphoryliert, der die Interaktion des *Stereogenic Factor 1* (SF-1) und *Steroid-Hormone-Receptor-Coactivator-1* (SRC1) und *CREB-Binding-Protein* (CBP) verhindert. Dadurch wird die Funktion des SF-1 gehemmt. IP₃ bewirkt eine Calciummobilisation aus dem Endoplasmatischen Retikulum, wodurch es über die Aktivierung von Calmodulin zur Stimulation der Calmodulinkinase (CAMK) kommt. Die CAMK aktiviert über die Stimulation verschiedener Transkriptionsfaktoren (*Nuclear-Receptor-Subfamily 4*, NR4A1-3; *CRE-Binding-Protein*, CREB; *CRE-Modulator*, CREM; *Activator-Transcription-Factor 2*, ATF-2) die Expression der Aldosteronsynthese (CYP11B2) und der 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Typ-2 (HSD3B2). Weitere Abkürzungen: *Ad4-Homologous-Region*, Ad4hR; *Neuronal-Growth-Factor-Induced-Clone-B-Response-Element*, NBRE. Abbildung aus Dringenberg *et al.*, 2013 [72].

Die Kopplung an ein Gi-Protein bewirkt bei Aktivierung des AT1R durch ATII eine Hemmung der Adenylatzyklase durch die G α i-Untereinheit. Dementsprechend erfolgt eine Inhibition des Kaliumkanals KCNJ5. Durch die nachfolgende Membrandepolarisation kommt es zum Calciumeinstrom in die Zelle [88]. Da in den Zellen der zG hauptsächlich Adenylatzyklasen vom Typ 5/6 vorkommen und diese durch hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen inhibiert werden, kommt es abermals zur Hemmung der cAMP-Bildung [89]. An dieser Stelle wird bereits deutlich, dass der Signalweg des AT1R die Kaskade des MC2R hemmt, da die Adenylatzyklase über zwei Mechanismen inhibiert wird. Diese Interaktion zwischen den Signalwegen der beiden Rezeptoren erklärt, wieso der MC2R zwar wie erwähnt in der zG exprimiert wird, seine Wirkung jedoch nicht entfalten kann. Dementsprechend kommt der zG vorrangig die Produktion von Mineralcorticoiden zu.

Ein weiterer Mechanismus wie der Signalweg des AT1R den des MC2R hemmt, ist durch die Inhibition des *Steroidogenic Factor 1* (SF-1), welcher durch den MC2R hochreguliert wird. Durch die AT1R-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C β , kommt es zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) zu Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) [90]. Diacylglycerin aktiviert die Proteinkinase C, welche die Expression der *Extracellular-Activated-Kinases* (ERK1/2) anregt, die wiederum den Transkriptionsfaktor c-Fos phosphoryliert. C-Fos verhindert die Interaktion zwischen SF-1 und seinen zur DNA-Bindung notwendigen Kofaktoren *Steroid-Hormone-Receptor-Coactivator-1* (SRC1) und *CREB-Binding-Protein* (CBP) [91]. Somit erfolgt eine Inhibition der Expression von CYP11B1 und CYP17A1.

Die Regulation des SF-1 ist von großer Bedeutung bei der Differenzierung zwischen zG und zF. Denn die Aldosteronsynthase (CYP11B2), welche die letzten beiden entscheidenden Schritte der Aldosteronsynthese in der zG katalysiert, ist im wesentlichen Unterschied zur 11 β -Hydroxylase (CYP11B1), welche für den letzten Schritt der Cortisolsynthese zuständig ist, nicht unter stimulierender Kontrolle des *Steroidogenic Factor* (SF-1). So wird CYP11B2 durch einige Polymorphismen im Promotor sogar von SF-1 inhibiert [83].

Wird die Phospholipase C β durch den AT1R aktiviert, entsteht durch die Hydrolyse von PIP2 auch IP3, welches eine Calciummobilisation aus dem intrazellulären Speichern des Endoplasmatischen Retikulums bewirkt. Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zur Aktivierung von Calmodulin, welches wiederum die Calmodulinkinase (CAMK) stimuliert [92]. Die aktivierte Calmodulinkinase phosphoryliert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die auch durch den MC2R-Signalweg aktiviert werden: *Cyclic-AMP-Response-Element-Binding-Protein* (CREB) [88], *Activator-Transcription-Factor 1* (ATF-1), *Activator-Transcription-Factor 2* (ATF-2) und *CRE-Modulator* [93]. Diese Transkriptionsfaktoren stimulieren letztendlich die Expression von CYP11B2 [94]. Außerdem aktiviert die CAMK über die Phosphorylierung des CREB die Mitglieder der *Neuronal-Growth-*

Factor-Induced-Clone-B-Familie (NGFI-B-Familie). Dazu zählt beispielsweise die *Nuclear-Receptor-Subfamily 4*: NR4A1, NR4A2, NR4A3 [95]. Da der Promotor von CYP11B2 ein sogenanntes *Neuronal-Growth-Factor-Induced-Clone-B-Response-Element* (NBRE) besitzt, wird CYP11B2 durch Mitglieder der NGFI-B-Familie hochreguliert [96].

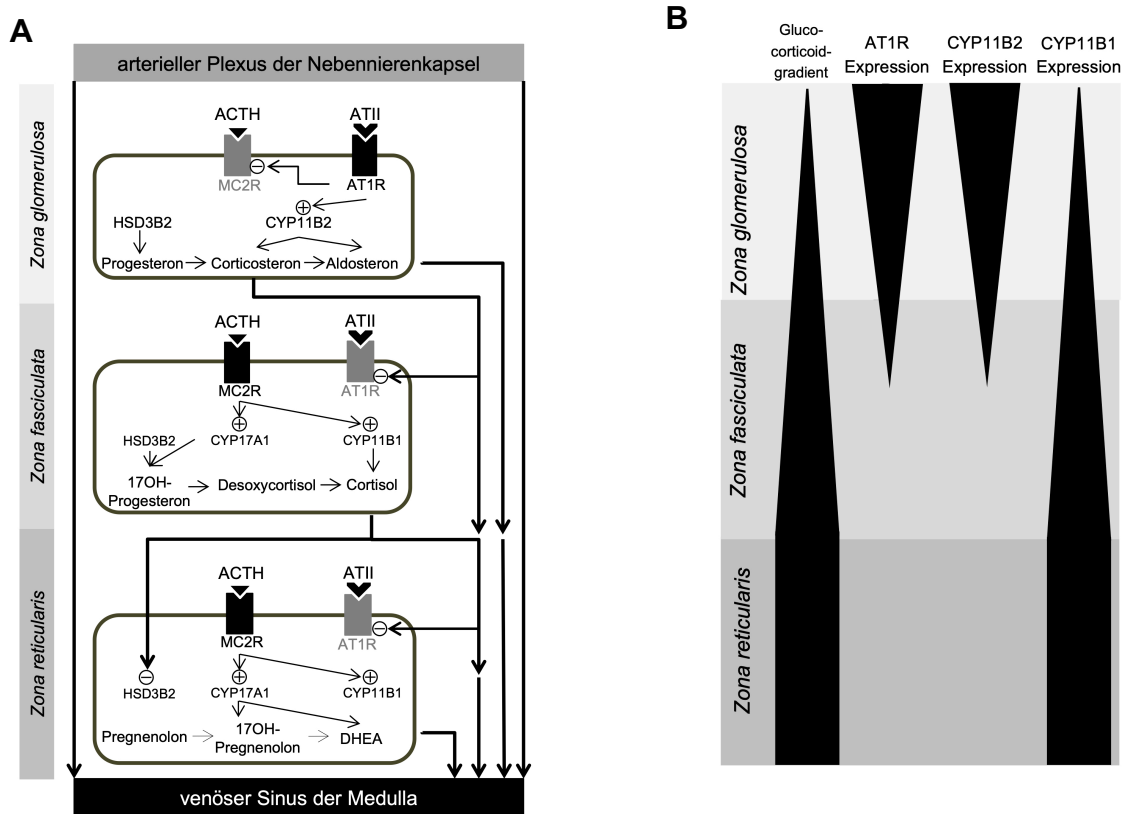


Abb. 1.10: Wechselseitiger Einfluss der Sekretionsprodukte der Nebennierenrinde. (A) Der Signalweg des Angiotensin-II-Rezeptors (Angiotensin-II-Rezeptor Typ1, AT1R) bewirkt die Hemmung des Signalweges des ACTH-Rezeptors (Melanocortin-2-Rezeptor, MC2R). Sodass die Zellen der *Zona glomerulosa* vor allem Aldosteron produzieren. Als Zwischenprodukt entstehen dabei aber auch Glucocorticoide (Corticosteron), welche zunehmend die Expression des AT1R hemmen. Dadurch kommt es zur Enthemmung des MC2R Signalweges und zur vermehrten Produktion von Cortisol. Dieses inhibiert seinerseits wiederum die 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Typ-2 (HSD3B2), was zur Folge hat, dass mehr Dehydroepiandrosteron (DHEA) produziert wird. Weitere Abkürzungen: Aldosteronsynthase (CYP11B2), 11 β -Hydroxylase (CYP11B1), 17 α -Hydroxylase (CYP17A). **(B)** Bereits Zellen der *Zona glomerulosa* produzieren Glucocorticoide. Dadurch kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Glucocorticoidkonzentration im Blut, das radiär, von dem subkapsulär gelegenen Gefäßplexus in Richtung Mark fließt. Die Glucocorticoide hemmen die Expression des Angiotensin-II-Rezeptor Typ1 (AT1R) mit steigender Konzentration. Dies hat im Wesentlichen zwei Folgen: zum einen sinkt die Expression der Aldosteronsynthase (CYP11B2), da sie unter positiver Kontrolle des AT1R steht, zum anderen wird der Signalweg des MC2R enthemmt, wodurch die Expression der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1) steigt. Die verstärkte Expression von CYP11B1 bewirkt eine erhöhte Cortisolproduktion.

Darüber hinaus aktiviert die NGFI-B-Familie den Promoter der 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Typ-2 (HSD3B2) [96]. Demgegenüber besitzt der Promotor von CYP11B1 kein NBRE, sodass die Faktoren der NGFI-B-Familie keinen Einfluss auf die Expression dieses Enzyms haben [97].

Das Phänomen, dass der MC2R in der gesamten NNR exprimiert wird, erlaubt die Schlussfolgerung, dass alle NNR-Zellen in der Lage sind Corticosteron und Cortisol zu synthetisieren. Die AT1R-Dichte nimmt kontinuierlich von der äußeren Zone der Nebennierenrinde in Richtung Nebennierenmark ab [86], während die Cortisolkonzentration von kortikal nach medullär zunimmt (Abb.1.10). Diese Beobachtungen legen nahe, dass der Gradient für Cortisol die Expression des AT1R kontrolliert [98]. Bestätigt wird diese Vermutung durch das Vorhandensein von vier Glucocorticoid-sensitiven Elementen im Promotor des AT1R. Binden Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexe an eines dieser Elemente, wird die Genexpression des AT1R gestoppt [99]. Das bedeutet, dass die AT1R-Expression und die damit verbundene Hemmung des MC2R-Signalweges nur bei niedrigen Glucocorticoidspiegeln möglich ist. Diese Bedingung wird in der *Zona glomerulosa* erfüllt. Die Glucocorticoidproduktion in der zG bewirkt eine zunehmende Inhibition der AT1R-Expression, was eine Enthemmung des MC2R-Signalweges bewirkt. Dies ermöglicht wiederum die Produktion von Glucocorticoiden in der *Zona fasciculata*.

Da die HSD3B2, wie auch CYP11B2 unter Kontrolle der AT1R-Signalweges steht, sinkt mit der Inhibition der AT1R-Expression auch die Genexpression dieser beiden Enzyme. Zusätzlich supprimiert Cortisol die HSD3B2-Expression [100]. Dies hat wiederum zur Folge, dass mit steigender Cortisolkonzentration und der daraus resultierenden Hemmung der HSD3B2, mehr Substrat für die Produktion von Androgenen, speziell für DHEA-S, verfügbar ist (Abb.1.3). Dadurch wird die Hormonsynthese in der *Zona reticularis* ermöglicht (Abb. 1.10).

1.5 Ziel der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, einen neuartigen Versuchsaufbau zu Erzeugung eines Morphogengradienten in Zellkultur zu etablieren. Nach der Hypothese von Hornsby und Dringenberg ist der gerichtete Blutfluss die Grundlage für die Entstehung und Ausrichtung des Morphogengradienten in der Nebenniere. Daher sollte eine Experimentieranordnung entwickelt werden, die einen kontinuierlichen Fluss von Kulturmedium in einer Zellkulturflasche ermöglicht. Dabei galt der Anspruch, dass die Verhältnisse in diesem Versuchsaufbau die Entstehung des vorherrschenden Morphogengradienten in der Nebenniere möglichst realitätsnah nachstellen. Eine weitere Voraussetzung war die Möglichkeit dem Kulturmedium verschiedene Substanzen beizumengen, um deren Einfluss auf die Funktion der Nebenniere zu untersuchen. Beispielsweise sollte in diesem Rahmen der von Dringenberg postulierte entscheidende Einfluss von Glucocorticoiden auf die NNR-Zonierung untersucht werden.

Für die Experimente wurde die humane, adrenocorticale Zelllinie NCI-H295R verwendet. Diese Zelllinie findet üblicherweise bei Zellkulturversuchen in der adrenalen Forschung Anwendung.

Im Vorfeld der Zellkulturexperimente sollte zunächst ein Versuch zur Visualisierung des Konzentrationsgradienten, der durch den neuartigen Versuchsaufbau erzeugt wird, durchgeführt werden. Dazu wurde gefärbtes Wasser in eine mit ungefärbtem Wasser gefüllte Zellkulturkammer geleitet. Um den direkten Nachweis eines Konzentrationsgradienten zu erbringen sollte die Glucosekonzentration im Medium der Perfusorspritze und im Medium des distalen Endes der Zellkulturflasche gemessen werden.

Eine weitere Anforderung an den Versuchsaufbau war die Möglichkeit die Zellen in Abhängigkeit ihrer Position aus dem Zellkulturgefäß zu entfernen. Dies war die Voraussetzung für die nachfolgenden Genexpressionsanalysen. Mit deren Hilfe sollte ermittelt werden, ob der einwirkende Morphogengradient eine positionsabhängige Veränderung der Rezeptor- und Enzymexpression bedingt und demnach einen anderen Funktionszustand der Zellen herbeiführen kann. Es sollte so auch überprüft werden, ob ein einzelner Zelltyp die verschiedenen Funktionen der Nebennierenrinde erfüllen kann, indem er durch eine Veränderung seiner Genexpression unterschiedliche Funktionszustände einnimmt.

Die Zielstellung der ersten Phase der Zellkulturexperimente war es, die Genexpression bestimmter entscheidender Enzyme bzw. Rezeptoren der Zellen im Grundzustand, ohne künstlichen Zufluss von Medium, zu untersuchen. Dabei wurde die Expression der Aldosteronsynthase (CYP11B2) analysiert, welche die letzten zwei Schritte der Aldosteronsynthese (zG) katalysiert. Außerdem wurde die Genexpression der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1), welche den letzten Schritt der Cortisolsynthese (zF) katalysiert und der 17 α -Hydroxylase (CYP17A1), welche die Steroidbiosynthese in Richtung Androgene (zR) lenkt, analysiert. Darüber hinaus wurde die Genexpression des Angiotensin-II-Rezeptors Typ1 (AT1R) und des Melanocortin-2-Rezeptors (MC2R), welcher die Wirkung von ACTH in der NNR vermittelt, bestimmt. Danach sollte eruiert werden, wie sich die Expression dieser Gene durch verschiedene Flussgeschwindigkeiten verändert.

In einer zweiten Phase sollte eine definierte Flussgeschwindigkeit festgelegt werden, mit der das Kulturmedium, versetzt mit verschiedenen modulierenden Substanzen, über die Zellen geleitet wurde. Anschließend erfolgten erneut Genexpressionsanalysen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Die NCI-H295R-Zelllinie

Die Zellen der NCI-H295R-Linie wurden ursprünglich bereits 1980 aus einem malignen Nebennierenkarzinom gewonnen. Die Patientin war eine 48-jährige Frau von den Bahamas, welche sich mit den Symptomen eines Steroidüberschusses, speziell Gewichtsverlust, Akne, Ödemen und Diarrhoe vorstellte. Außerdem konnte man bei ihr einen Hyperaldosteronismus feststellen.

Die Zellen wurden zunächst in vier verschiedenen Medien kultiviert, wobei sich herausstellte, dass das sog. HITES-Medium am besten geeignet war. Das HITES-Medium ist ein einfaches Kulturmedium, welches, dem Akronym entsprechend, Hydrocortison, Insulin, Transferrin, Estradiol und Selenium enthält. Mithilfe eines Radioimmunassay des Zellüberstandes nach sechsjähriger Zellkultur konnte eine Steroidsekretion der Zelllinie festgestellt werden. Insgesamt wurden mit Hilfe einer Massenspektrometrie 30 Steroide detektiert. Dabei fand man hohe Konzentrationen von Pregnenolon, 17-Hydroxypregnenolon und Dehydroepiandrosteron (DHEA), sowie mittlere Konzentrationen von 17-Hydroprogesteron, Aldosteron, 11-Desoxycortisol, Progesteron, Androstendion und Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S). Aus den eben erwähnten Analysen lässt sich schließen, dass die Zellen der NCI-H295R-Linie funktionelle Eigenschaften aller drei Schichten der Nebennierenrinde besitzen [101].

2.1.2 Die Kultivierung von NCI-H295R-Zellen

Die NCI-H295R-Zellen wurden bei der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) erworben und wie gefordert in Kultur genommen. Zur Herstellung des Basismediums wurde serumfreies Roti®-CELL DMEM F12 (500 ml; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, welchem 5 ml ITS+ Premix (Corning Inc., Corning, USA) zugefügt wurde, um die zusätzlichen Supplemente in der notwendigen Konzentration (0,00625 mg/ml Insulin; 0,00625 mg/ml Transferrin; 6,25 ng/ml Selenium; 1,25 mg/ml bovines Serumalbumin; 0,00535 mg/ml Linolsäure) zuzusetzen. Außerdem wurden 12,5 ml Nu-Serum (Corning Inc., Corning, USA) zugegeben, sodass dieses in einer finalen Konzentration von 2,5% im Zellmedium vorlag. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 95 % Raumluft, 5 % Kohlendioxid (CO₂) und in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Dem Kulturmedium wurden keine Antibiotika zugesetzt.

Die Zellen wurden in eine 250-ml-Zellkulturflasche ausgesät. Sobald sie begannen, sich zu überlagern, erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Splitting. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und 15 ml PBS-Puffer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben, welcher

erneut abgesaugt wurde. Anschließend wurde zum Ablösen der adhärennten Zelle von der Zellkulturflasche 1 ml 0,25 % Trypsin-EDTA (Gibco by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA) hinzugegeben und die Flasche bei 37°C für fünf Minuten bebrütet. Die abgelösten Zellen wurden mit frischem Medium von ihrer Unterlage gespült, die Zell-Trypsin-Medium-Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Je nach Zielstellung wurden die Zellen in neue 250-ml-Zellkulturflasche (75 cm²) (Verhältnis 1:4) oder in einer 5-ml-x-well-Zellkulturkammer (9 cm², Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) ausgesät und inkubiert.

Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dabei wurden 40 µl von einer 1-ml-Zellsuspensionsprobe mit 40 µl Trypanblau in eine Vertiefung der Platte gegeben. Die Zellzahl wurde nach Auszählung wie folgt berechnet:

$$\text{Mittelwert der gezählten Zellzahlen} \times 10^4 \times 2.$$

2.1.3 Die Kultivierung von HUVEC-Zellen

Die verwendeten Humanen-Umbilikal-Venen-Endothel-Zellen (HUVEC) wurden bei ATCC (Manassas, USA) erworben und in Kultur genommen. Als Basismedium wurde wie vom Hersteller gefordert F12K (Kaigh's Modifikation des Ham's F12 Medium; ATCC, Manassas, USA) verwendet, welches in seiner Zusammensetzung dem herkömmlichen DMEM F12 sehr ähnlich ist. Es unterscheidet sich lediglich in der Konzentration der Aminosäuren und enthält kein HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure). Da das F12K-Medium keine Wachstumsfaktoren enthält, wurden diesem Medium 15mg *Endothelial-Cell-Growth-Supplement* (ECGS; Corning Inc., Corning, USA) zugegeben, das eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise FGF1 (*Fibroblast-Growth-Factor*) oder ECGF-a (*Endothelial-Cell-Growth-Factor-A*) enthält. Die finale Konzentration von ECGS betrug 0,03 mg/ml. Weiterhin wurden 50 mg Heparin (Endkonzentration 0,1 mg/ml) und 50 ml fetales Kälberserum zugegeben.

Die Zellen wurden in 250-ml-Zellkulturflaschen mit 15 ml Kulturmedium ausgesät und wie die NCI-H295R-Zellen in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 37°C, 95 % Raumluft, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Sobald die Zellen die Wachstumsfläche der Zellkulturflasche nahezu komplett ausfüllten, wurden sie mit der gleichen Methode wie die NCI-H295R Zellen (2.1.2) von ihrer Unterlage abgelöst und im Verhältnis 1:4 erneut in 250ml-Zellkulturflaschen ausgesät.

2.1.4 Die Herstellung von endothelzellkonditioniertem Medium

Für die Herstellung von endothelzellkonditioniertem Medium (ECCM) wurden die HUVEC-Zellen so lange inkubiert, bis sie den Boden der Zellkulturflasche vollständig ausfüllten. Dann wurde zunächst das für die Kultivierung der HUVEC-Zellen verwendete Medium (F12K mit Supplementen) abgesaugt und verworfen. Anschließend wurden die HUVEC-Zellen durch mehrfaches Überspülen und Absaugen von PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden die HUVEC-Zellen für 24 Stunden mit dem Basismedium der NCI-H295R-Zellen (DMEMF12 + Supplemente) bebrütet, damit dieses die Sekretionsprodukte der HUVEC-Zellen aufnimmt. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde das (nun von Endothelzellen konditionierte) Medium aus der Zellkulturflasche in ein Falcon-Röhrchen überführt, bei 1400 UpM für 5 Minuten zentrifugiert und in ein neues Röhrchen pipettiert. Danach wurden die HUVEC-Zellen erneut mit F12K-Medium für mindestens 24 Stunden inkubiert, bevor der Zyklus erneut begann und sie wieder mit dem Basismedium der NCI-H295R-Zellen bebrütet wurden.

2.2 Die Stimulation der NCI-H295R-Zellen

2.2.1 Der theoretische Aufbau des Gradienten in der Zellkultur

Der Zielstellung der Experimente entsprechend, sollte in der Zellkulturflasche ein Konzentrationsgradient eines bestimmten Stoffes erzeugt werden.

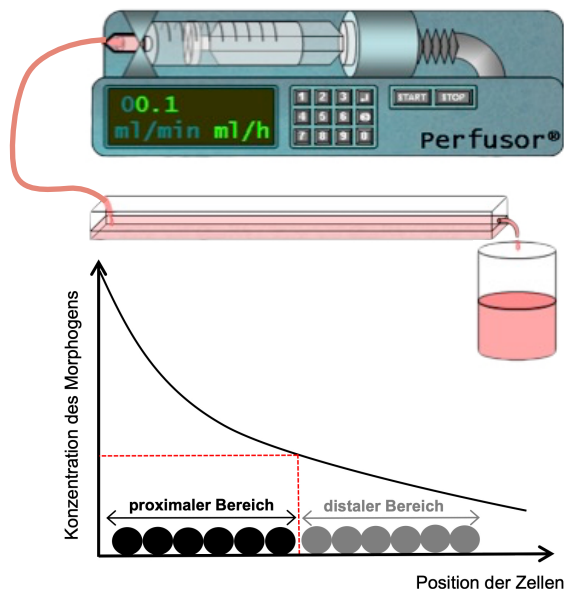


Abb. 2.1: Schema des Versuchsaufbaus. Das Kulturmedium wurde in eine Perfusorspritze gefüllt und anschließend mit einer Flussrate von 1 ml/h in eine Zellkulturflasche gepumpt. Die Zellkulturflasche verfügte über einen Abfluss, sodass in gleichem Maße Medium abfließen konnte. Im nächsten Schritt wurde die Flussrate auf 2 ml/h erhöht. In den nachfolgenden Versuchen wurden dem Medium in der Perfusorspritze verschiedene Stoffe zugesetzt, sodass sich ein Konzentrationsgradient der jeweiligen Substanz im Medium der Zellkulturflasche aufbaute.

Um dies zu erreichen, sollte kontinuierlich Medium an einem Ende der Zellkulturflasche eingeleitet und an dem gegenüberliegenden Ende ausgeleitet werden. In dem proximalen Teil der Zellkulturflasche, wo das Medium eingeleitet wird, müsste somit eine höhere Konzentration des ausgewählten Stoffes (Morphogens) herrschen als in dem übrigen Areal, dem distalen Bereich, da die Konzentration des Morphogens im proximalen Bereich durch fortlaufende Zugabe kontinuierlich erhöht wird. Somit fließt das Morphogen von dem Ort der höheren Konzentration (proximaler Bereich) zum Ort niedrigerer Konzentration (distaler Bereich), wo es wiederum ablaufen kann. Dabei ist der Konzentrationsgradient entlang der Flussrichtung des Mediums gerichtet (Abb. 2.1).

2.2.2 Die praktische Umsetzung des Aufbaus eines Konzentrationsgradienten in Zellkultur

Die NCI-H293R-Zellen wurden in einer x-well-Zellkulturkammer (Flasche auf Glas-Objektträger ablösbar; Wachstumsfläche von 9 cm²; Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) ausgesät und wuchsen dort für 24 Stunden an. Die Zellzählung ergab, dass 3,2 Millionen Zellen anwachsen konnten, bis sie anfangen, sich zu überlagern. In die Zellkulturflasche wurden steril zwei Öffnungen gebohrt. In die eine Öffnung wurde eine Kanüle eingebracht, welche durch einen Schlauch mit einer mit Medium gefüllten Spritze verbunden war. Die Spritze wiederum wurde in eine Spritzenpumpe (Perfusor®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) eingespannt. Die andere Öffnung diente als Ablauf für überschüssiges Medium. Die Spritzpumpe wurde außerhalb des Inkubators positioniert, während die Zellkulturflaschen mit Auffangbehältnis im Inkubator standen (Abb. 2.2).

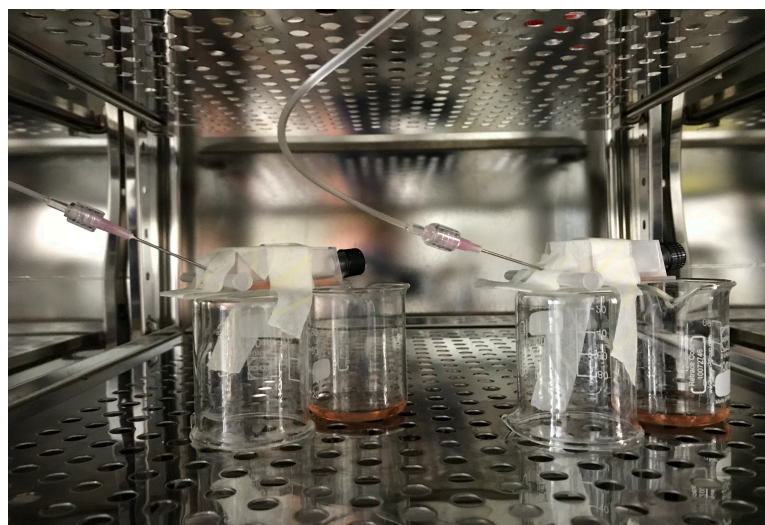


Abb. 2.2: Versuchsaufbau in der Realität. In die zwei Zellkulturflaschen wurde jeweils durch eine Kanüle das Medium gepumpt. Die Kanülen waren über ein Schlauchsystem mit zwei Spritzpumpen verbunden, die sich außerhalb des Inkubators befanden. Überschüssiges Medium konnte über eine Öffnung nahe dem Schraubverschluss in ein Becherglas abfließen.

Um Informationen zu erhalten, ob sich durch die neuartige Versuchsanordnung ein Konzentrationsgradient aufbaut, wurde gefärbtes Wasser in eine mit ungefärbtem Wasser gefüllte Zellkulturkammer geleitet (Abb. 2.3). Außerdem wurde die Glucosekonzentration im Medium der Perfusorspritze, damit am proximalen Ende der Zellkulturkammer (C_{prox}) und im Medium des distalen Endes der Zellkulturflasche (C_{dist}) bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten gemessen. Dazu wurde der Glucosesensor GlucoCheck (Aktivmed GmbH, Rheine, Deutschland) verwendet. Die Daten wurden anschließend durch erneute Messung mit dem Glucosesensor DexcomG6 (Dexcom Deutschland GmbH, Mainz, Deutschland) verifiziert.

Für die Zellkulturexperiment wurde zunächst die Menge von 48 ml des Zellkulturmediums der NCI-Zellen (DMEM-F12 mit ITS+Premix und Nu-Serum) in die Spritzen gefüllt und die Spritzpumpe auf 1 ml/h programmiert. Dementsprechend wurde den Zellen für 48 Stunden, pro Stunde 1 ml frisches Medium zugeführt. In gleichem Maße floss das Medium auf der anderen Seite der Flasche in ein Auffangbehältnis. Durch den kontinuierlichen Zu- und Abfluss des Mediums, wurden die Zellen immer nur durch eine dünne Schicht von diesem bedeckt.

In einem nächsten Schritt wurde die Flussrate des Mediums von 1 ml/h auf 2 ml/h erhöht, sodass für 48 Stunden den Zellen 2 ml frisches Medium pro Stunde zugeführt wurden. Da die verwendeten Perfusorspritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) nur ein Fassungsvermögen von 50 ml aufwiesen, mussten sie nach 24 Stunden ausgetauscht werden. Des Weiteren wurden dem DMEM-F12-Medium zusätzlich zu den obligaten Zusätzen (ITS+Premix und Nu-Serum) verschiedene Stoffe zugefügt (Tab. 2.1). Die Flussrate wurde dabei immer auf 1 ml/h für 48 h festgelegt. Zunächst wurde Dexamethason dazugegeben, sodass eine Endkonzentration von 0,75 µg/ml erreicht wurde.

A



B



Abb. 2.3: Versuchsaufbau mit gefärbtem Wasser. (A) Seitensicht der Zellkulturkammer, welche mit 5 ml ungefärbtem Wasser gefüllt wurde. Anschließend wurde langsam Trypanblau-gefärbtes Wasser eingeleitet. **(B)** Draufsicht auf die Zellkulturkammer.

Danach wurden, für eine Endkonzentration von 30% ECCM, 14,4 ml ECCM mit 33,6 ml Zellkulturmedium gemischt. Da die Zellen der NCI-H295R-Linie nur marginal auf ACTH ansprechen [102], wurde Forskolin, ein Aktivator der Adenylatcyclase, verwendet, um den Effekt einer Aktivierung des MC2R zu simulieren. Die Endkonzentration von Forskolin im verwendeten Medium betrug 10 µM. Angiotensin wurde in physiologischer Konzentration (25 pg/ml) und anschließend in supraphysiologischer Konzentration (2500 pg/ml) verwendet.

Tabelle 2.1: Übersicht über die Interventionen. Das Zellkulturmedium (ZKM) entspricht DMEM-F12 mit zugesetztem ITS-Premix und Nu-Serum. Zunächst wurden einige Versuche ohne Fluss (0 ml/h) durchgeführt. Danach wurde in mehreren Versuchsreihen 1 ml bzw. 2 ml frisches ZKM pro Stunde in die Zellkulturflasche geleitet. Dem ZKM wurden in weiteren Versuchen verschiedene Stoffe zugesetzt.

Intervention	Konzentration des Zusatzes
0 ml/h	
1 ml/h Zellkulturmedium	
2 ml/h Zellkulturmedium	
1 ml/h Zellkulturmedium + endothelzellkonditioniertes Medium	30 %
1 ml/h Zellkulturmedium + Forskolin	10 µM
1 ml/h Zellkulturmedium + Dexamethason	0,75 µg/ml
1 ml/h Zellkulturmedium + Angiotensin II	25 pg/ml
1 ml/h Zellkulturmedium + Angiotensin II	2500 pg/ml

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Extraktion

Die Fläche des Objektträgers, auf dem die Zellen anwuchsen, wurde aus praktischen Gründen in zwei gleich große Zonen unterteilt - statt in drei Zonen, wie sie in der Nebenniere vorliegen. Die proximale Zone P entspricht dem Teil, in dem das Medium eingeleitet wurde. Die distale Zone D entspricht der Zone, wo das Medium ausgeleitet wurde.

Die Zellen aus den jeweiligen Zonen P und D wurden mit Hilfe eines Zellschabers von dem Objektträger gelöst, voneinander getrennt in Medium suspendiert und anschließend für 3 Minuten bei 1800 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abermals zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Im Anschluss erfolgte die RNA-Isolation der Zellpellets (Abb. 2.3).

Zur Homogenisierung der Zellen wurde das QIAshredder-Kit (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland) genutzt. Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden durch Zugabe von 350 µl

RTL-Puffer lysiert, nachfolgend in eine QIAshredder-Spin-Säule überführt und 2 Minuten bei 11000 UpM zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde 1:1 mit 70%igen Ethanol versetzt, die Gesamtmenge von 700 µl in eine RNeasy-Spin-Säule überführt (die QIAshredder-Spin-Säule wurde verworfen) und 15 Sekunden bei 11000 UpM zentrifugiert. Bei diesem Schritt wurde die RNA an die RNeasy-Säule gebunden, sodass das Lysat im Sammelröhrchen verworfen wurde. Anschließend wurden 700 µl RW1-Puffer in die Säule gegeben, diese abermals für 15 Sekunden mit 11000 UpM zentrifugiert und der Inhalt des Sammelröhrchens verworfen. Dieser Waschschrift wurde mit 500 µl RPE-Puffer wiederholt. Danach wurden abermals 500 µl RPE-Puffer in die Säule pipettiert und für 2 Minuten bei 11000 UpM zentrifugiert. Für den letzten Schritt wurde die RNeasy-Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, eine Menge von 50 µl RNase-freies-Wasser zugegeben und für 1 Minute mit 11000 UpM zentrifugiert. Bei diesem Schritt wurde die RNA von der Säule gelöst und aufgefangen. Anschließend wurde die Ribonukleinsäurekonzentration photometrisch bestimmt.

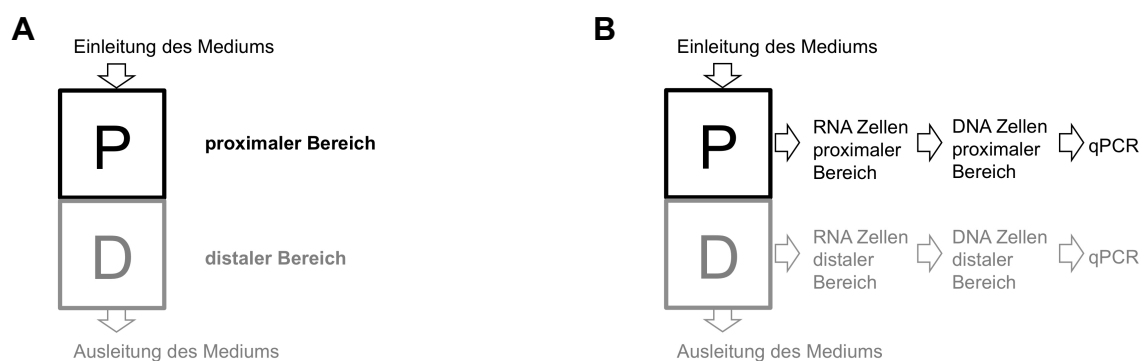


Abb. 2.4: Prinzip der Auswertung. (A) Dargestellt ist ein Schema der Fläche des Objekträgers, auf dem die Zellen anwuchsen. Dieser wurde in zwei Bereiche eingeteilt. Der proximale Bereich P entspricht der Seite der Zellkulturflasche, auf der das Medium eingeleitet wurde. Der distale Bereich D entspricht der Seite der Zellkulturflasche, auf der das Medium ausgeleitet wurde. (B) Die Zellen der Bereiche P und D wurden nach dem Ablauf des Versuchs getrennt voneinander mit Hilfe eines Zellschabers von dem Objekträger entfernt. Nach der RNA-Isolation erfolgte die Umschreibung in DNA, sowie eine Real-Time-PCR (qPCR).

2.3.2 Photometrische Bestimmung der Ribonukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA erfolgte mit dem BioSpectrometer® (Eppendorf Ag, Hamburg, Deutschland). Dabei wurde die µCuvette G1.0 (Eppendorf Ag, Hamburg, Deutschland) verwendet, sodass 1,5 µl der RNA-Lösung für die Analyse genügten. Das Extinktionsmaximum von RNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Diese Wellenlänge wurde zur Bestimmung des Extinktionsfaktors jeder RNA-Probe verwendet, aus

welchem wiederum die Konzentrationsberechnung erfolgte. Dabei entspricht ein Extinktionsfaktor von 1,0 bei 260 nm ($A_{260} = 1$) 40 µg ssRNA/ml.

Die Messung der Absorption bei 260nm sagt lediglich etwas über die Quantität aus, jedoch nicht über die Qualität. Zur Detektion von Verunreinigungen mit Proteinen wurde deshalb die Extinktion bei 280 nm gemessen. Denn aus dem Verhältnis der Extinktion von 260 nm zu 280 nm können Rückschlüsse über die Reinheit der RNA-Probe gezogen werden.

2.3.3 Komplementäre DNA-Synthese

Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA), durch reverse Transkription wurde das *Ready-To-Go-T-Primed-First-Strand-Kit* (GE Healthcare, Chicago, USA) verwendet. Jedes Reaktionsgefäß des Kits (*First-strand-reaction-mix-tube*) beinhaltet sämtliche für die cDNA-Synthese notwendige Komponenten: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, reverse Transkriptase, RNase-Inhibitor, RNase/DNase-freies-BSA (Bovines Serum Albumin), Oligo d(T)18 primer.

Zur cDNA-Synthese wurden 25-30 µl der RNA-Probe verwendet. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Probe zwischen 0,002 µg und 2 µg RNA enthält. Die RNA-Probe wurde für 10 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend parallel zu dem *First-strand-reaction-mix-tube* für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA-Probe in das Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Danach wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes durch Vortexen und anschließendes kurzes Zentrifugieren bei 1000 UpM gründlich durchmischt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Probe für 60 Minuten bei 37°C, gefolgt von einer 5-minütigen Phase bei 95°C für 5 Minuten, um die Denaturierung der reversen Transkriptase zu erreichen. Die entstandene komplementäre DNA wurde nun entweder direkt für die PCR verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.3.4 Realtime quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Die quantitative Echtzeit-PCR ermöglicht die gezielte Vervielfältigung und Quantifizierung von Genabschnitten. Dafür wurden das *QuantiTect-SYBR®-Green-PCR-Kit* und *QuantiTect-Primer-Assays* (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland) verwendet.

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird zunächst durch Hitzeeinwirkung (95°C) die doppelsträngige DNA denaturiert, sodass im nächsten Schritt die Primerhybridisierung am 3'-Ende stattfinden kann. Die nun folgende Elongation des komplementären Strangs durch eine hitzestabile Taq-Polymerase beendet einen PCR-Zyklus. Diese Zyklen werden bis zu 40 Mal wiederholt, wodurch sich die DNA eines bestimmten Genabschnittes exponentiell amplifiziert. Die Quantifizierung der PCR-Produkte kann mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR-Green* durchgeführt werden, welcher sequenzunabhängig an die doppelsträngige DNA bindet. Angeregt durch blaues Licht (480 nm) emittiert an DNA gebundener Farbstoff 1000 Mal

stärker das Licht als ungebundenes *SYBR-Green*. Dabei liegt das Maximum des emittierten Lichtes bei 520 nm. Da nach jedem PCR-Zyklus mehr DNA-Moleküle vorliegen, steigt somit auch die Stärke des Fluoreszenzsignals an. Als Maß für die Menge an DNA wird nun der Ct-Wert (cycle threshold) bestimmt. Dieser Wert entspricht der Anzahl an Reaktionszyklen, die notwendig sind, um so viele DNA-Moleküle mit angelagertem SYBR-Green anzuhäufen, dass das Fluoreszenzsignal einen Schwellenwert überschreitet und sich gerade deutlich genug vom Hintergrundsignal abhebt. Je mehr cDNA-Kopien eines entsprechenden Genabschnittes eine Probe enthält, desto weniger Zyklen sind notwendig, um den Schwellenwert zu überschreiten, und umso kleiner ist der Ct-Wert.

Um Aussagen über die funktionellen Eigenschaften der Zellen treffen zu können, erfolgte die Expressionsanalyse folgender Gene: CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, MC2R, AT1R. Dafür wurden *QuantiTect-Primer-Assays* (Qiagen, Hilden, Deutschland) genutzt. Der für die qPCR verwendete *QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Master-Mix* (Qiagen, Hilden, Deutschland) enthielt unter anderem die HotStarTaq®-DANN-Polymerase, einen dNTP Mix, *SYBR-Green*, 5 mM MgCl₂ sowie Reaktionspuffer.

In jedes *well* wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert (Tab. 2.2):

Tabelle 2.2: Pipettierschema für die Reaktionsansätze der qPCR

Komponente	Mengenangabe [μ l]
Quantitect-RT-SYBR-Green Mix	12,5
Primer-Mix [10 pmol/ μ l]	2,5
cDNA [100 ng/Reaktion]	2
H ₂ O (RNase frei)	8
Σ	25

Für die PCR wurde der *CFX96-Touch™-Real-Time-Thermal-Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, USA) verwendet. Dieser wurde wie folgt programmiert (Tab. 2.3):

Tabelle 2.3: Programmeinstellung für die qPCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklenanzahl
DNA-Polymerase Aktivierung	95	5:00 - 15:00	1
Denaturierung	94	0:15	35-45
Annealing	50-60	0:30	
Elongation	72	0:30	
Schmelzkurve			

2.4 Datenauswertung

Die Grundlage für die relative Quantifizierung der Expression der Zielgene (CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, MC2R, AT1R) bildeten ihre spezifischen Ct-Werte aus der qPCR (Kapitel 2.3.4). Mit Hilfe des „ $\Delta\Delta CT$ “ Berechnungsmodells wurde aus den CT-Werten die relative Genexpression, normalisiert zum *housekeeping*-Gen β -Actin, berechnet. Die Säulendiagramme zur Darstellung der relativen Genexpression wurden mit dem Programm GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA) erstellt. In den Diagrammen sind die Mittelwerte der einzelnen Datengruppen der jeweiligen Intervention mit der entsprechenden Standardabweichung (SD) dargestellt. Zum statistischen Vergleich von zwei Datengruppen der Genexpressionsanalysen wurde der *student's t-test* durchgeführt. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % ($p < 0,05$) wurde ein Unterschied zwischen zwei Datengruppen als signifikant angesehen. Der Signifikanzwert (p-Wert) wurde innerhalb der Diagramme mit dem Symbol „*“, in den Stufen * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, angegeben.

Zum statistischen Vergleich der Glucosekonzentrationen wurden die Differenzen der Konzentrationen am distalen Ende der Zellkulturkammer (C_{dis}) und der Konzentrationen in der Perfusorspritze, damit am proximalen Ende der Zellkulturkammer (C_{prox}), wie folgt gebildet: $\Delta[C] = [C_{dis}] - [C_{prox}]$. Außerdem wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, um zu überprüfen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der Glucosekonzentrationen bei den einzelnen Flussgeschwindigkeiten besteht. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % ($p < 0,05$) wurde der Unterschied zwischen den Datengruppen als signifikant angesehen. Anschließend wurde eine Post-hoc-Analyse mit Hilfe des Dunnett-Tests durchgeführt, um zu bestimmen zwischen welchen Datengruppen ein signifikanter Unterschied besteht. Die Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm MedCalc (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

3 Ergebnisse

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, einen Versuchsaufbau zur Herstellung eines Konzentrationsgradienten in Zellkultur zu etablieren (Kapitel 2.2.2). Durch den durchgeführten Versuch mit Trypanblau-gefärbtem Wasser konnte ein Konzentrationsgradient sichtbar gemacht werden. Die Bestimmung der Glucosekonzentrationen im Medium der Perfusorspritze, damit am proximalen Ende der Zellkulturkammer (C_{prox}) und im dem Medium des distalen Endes der Zellkulturkammer (C_{dist}) ergab (MW \pm SD): $C_{\text{prox } 0,5\text{ml/h}} = 17,78 \text{ mmol/l} \pm 0,24 \text{ mmol/l}$, $C_{\text{dist } 0,5\text{ml/h}} = 15,63 \text{ mmol/l} \pm 0,46 \text{ mmol/l}$, $C_{\text{prox } 1\text{ml/h}} = 18,03 \text{ mmol/l} \pm 0,68 \text{ mmol/l}$, $C_{\text{dist } 1\text{ml/h}} = 16,14 \text{ mmol/l} \pm 0,48 \text{ mmol/l}$, $C_{\text{prox } 2\text{ml/h}} = 19,25 \text{ mmol/l} \pm 1,28 \text{ mmol/l}$, $C_{\text{dist } 2\text{ml/h}} = 18,17 \text{ mmol/l} \pm 1,23 \text{ mmol/l}$. Die Analyse der Differenzen der Konzentrationen (Kapitel 2.4) ergab (MW \pm SD): $\Delta C_{0,5\text{ml/h}} = 2,14 \text{ mmol/l} \pm 0,35 \text{ mmol/l}$, $\Delta C_{1\text{ml/h}} = 1,89 \text{ mmol/l} \pm 0,5 \text{ mmol/l}$, $\Delta C_{2\text{ml/h}} = 1,08 \text{ mmol/l} \pm 0,59 \text{ mmol/l}$. Es zeigte sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der Konzentrationen ($p < 0,009$). Die Post-hoc-Analyse ergab, dass die Konzentrationsdifferenz bei 2 ml/h im Vergleich zu 0,5 ml/h und 1ml/h signifikant kleiner ist. Potenziell vorhersehbare Komplikationen, wie eine bakterielle Inokulation durch die offene Zellkulturflasche oder ein zu schnelles Abfließen des Mediums und damit eine Austrocknung der Zellen, nicht auf. Auch die durchgeführten Kontrolluntersuchungen auf Mykoplasmen mit Hilfe einer PCR waren negativ. Die Zellen wirkten, nach Ablauf von 48 Stunden in denen der erzeugte Konzentrationsgradient auf sie einwirken konnte, morphologisch unverändert. In einem zweiten Schritt wurden die molekularen Auswirkungen des Gradienten auf die Steroidbiosynthese in den verwendeten NCI-H295R-Zellen untersucht. Dazu wurden Genexpressionsanalysen wichtiger Enzyme der Steroidbiosynthese durchgeführt. Dazu gehören die Aldosteronsynthase (CYP11B2), die 11 β -Hydroxylase (CYP11B1) und die 17 α -Hydroxylase (CYP17A1). Die jeweilige Funktion dieser Enzyme im Rahmen der Steroidbiosynthese ist in der Abbildung 1.3 dargestellt. Außerdem wurde die Expression des ACTH-Rezeptors (MC2R) und des Angiotensinrezeptors (AT1R) analysiert. Dabei wurden zum einen die Unterschiede zwischen dem proximalen Bereich (höhere Konzentration des eingeleiteten Morphogens) und dem distalen Bereich (niedrigere Konzentration des Morphogens) untersucht. Zum anderen wurde analysiert, wie sich die Expression der Gene durch die verschiedenen Interventionen (Tab. 2.1) verändert. In den nachfolgenden Abbildungen wird die relative Genexpression der untersuchten Gene normiert zu β -Actin dargestellt.

3.1 Einfluss der in Zellkultur erzeugten Morphogengradienten auf die relative Genexpression des Melanocortin-2-Rezeptors

Die Wirkung von ACTH auf die Steroidbiosynthese in der Nebenniere wird durch den Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R) vermittelt [103]. Um Aussagen treffen zu können, wie sich das Expressionslevel des MC2R durch den neuartigen Versuchsaufbau ändert, wurde zunächst die relative Genexpression bei 24-stündiger Inkubation mit Zellkulturmedium (ZKM) ohne Fluss (0 ml/h ZKM) bestimmt. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem proximalen und distalen Bereich. Danach wurden die Versuchsbedingungen verändert und kontinuierlich pro Stunde 1 ml frisches ZKM (1 ml/h ZKM) in die Zellkulturflasche geleitet (vgl. 2.2.1). Hier zeigte sich eine Erhöhung des Expressionsniveaus im Vergleich zu 0 ml/h ZKM. Außerdem stellte sich im distalen Bereich eine signifikant höhere Genexpression ($p < 0,0038$) im Vergleich zum proximalen Abschnitt dar.

Bei Erhöhung des Mediumzuflusses auf 2 ml/h (2 ml/h ZKM) wurde eine verminderte Genexpression von MC2R im Vergleich 1 ml/h ZKM gemessen. So lag die Höhe der ermittelten relativen Genexpression bei 2 ml/h ZKM im Bereich der Messwerte von 0 ml/h Mediumfluss. Es konnte dabei kein Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich

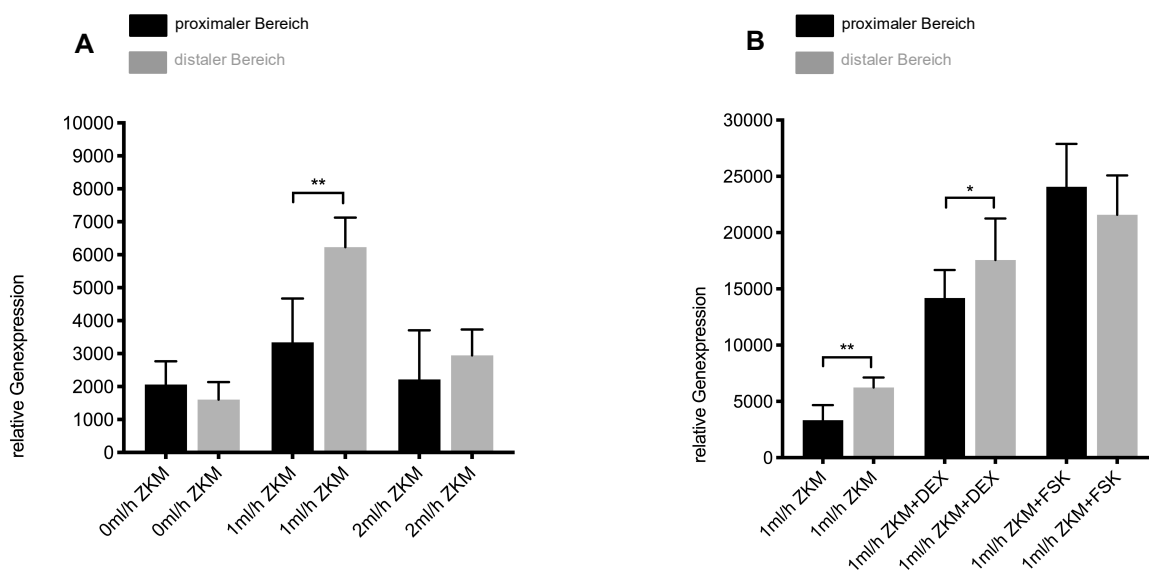


Abb. 3.1.1 A/B: Relative Genexpression des Melanocortin-2-Rezeptors (MC2R). (A) Die Genexpression des MC2R war ohne Zufluss von Zellkulturmedium (0 ml/h ZKM) und bei Zufluss von 2 ml ZKM pro Stunde (2 ml/h ZKM) im distalen und proximalen Abschnitt ohne signifikanten Unterschied ($n = 5-7$). Bei Zufluss von 1 ml ZKM pro Stunde (1 ml/h ZKM) stellte sich eine signifikant höhere Expression im distalen Bereich dar ($p < 0,0038$, *student's t-test*; $n = 7$). (B) Die Zuleitung von ZKM versetzt mit Dexamethason ([DEX] = 0,75 $\mu\text{g/ml}$) bzw. Forskolin ([FSK] = 10 μM) mit einer Geschwindigkeit von 1ml/h, bewirkte eine starke Induktion der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM ($n = 5-10$). Im Versuchsaufbau mit Dexamethason zeigte sich eine signifikant stärkere Genexpression im distalen Bereich verglichen mit dem proximalen Abschnitt ($p < 0,0394$, *student's t-test*).

ermittelt werden (Abb. 3.1.1 A). Des Weiteren erfolgte die Zugabe von Dexamethason, Forskolin, endothelzellkonditioniertem Medium und Angiotensin II zum Zellkulturmedium (ZKM), um eine mögliche Veränderung der Genexpression im Vergleich zum reinen ZKM beurteilen zu können. Die Fließgeschwindigkeit wurde dabei auf 1 ml/h festgesetzt.

Durch die Zugabe von Dexamethason zum Kulturmedium (Endkonzentration 0,75 µg/ml) erhöhte sich das Genexpressionsniveau erheblich. Es zeigte sich dabei eine signifikant stärkere Genexpression im distalen Bereich, verglichen mit dem proximalen Abschnitt ($p < 0,0394$; Abb. 3.1.1 B). Die Zugabe von Forskolin zum Kulturmedium (Endkonzentration 10 µM) bewirkte eine weitere Erhöhung des Expressionslevels im Vergleich zu Dexamethason. Dabei wurde im proximalen Bereich eine tendenziell höhere Genexpression, verglichen mit dem distalen Abschnitt, ermittelt (Abb. 3.1.1 B).

Bei der Zufuhr von 1 ml Endothelzellkonditioniertem-Medium pro Stunde (ECCM, 30%) zeigte sich ebenfalls eine starke Erhöhung der Genexpression im Vergleich 1 ml/h ZKM (Abb. 3.1.2 A). Es wurde eine signifikant höhere Expression im distalen Teil der Zellkulturflasche verglichen mit dem proximalen Abschnitt gemessen ($p < 0,0014$).

Die Zugabe von Angiotensin II in physiologischer Menge zum ZKM (Endkonzentration 25 pg/ml) bewirkte eine starke Erhöhung der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem distalen und dem proximalen Abschnitt

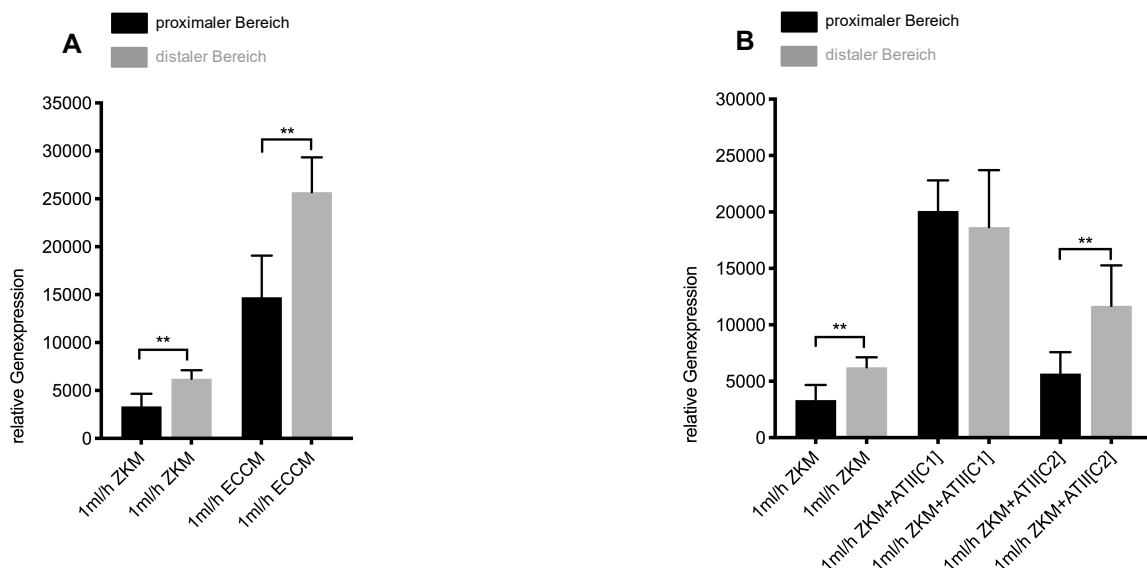


Abb. 3.1.2 A/B: Relative Genexpression des Melanocortin-2-Rezeptors (MC2R). (A) Der Zufluss von 1 ml endothelzellkonditioniertem Medium ([ECCM] = 30%) pro Stunde bewirkte einen starken Anstieg der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM und eine signifikant höhere Expression im distalen Bereich ($p < 0,0014$, *student's t-test*; $n = 5$) verglichen mit dem proximalen Abschnitt. (B) Die Zuleitung von 1 ml ZKM mit zugesetztem Angiotensin II ([ATII/C1] = 25 pg/ml) pro Stunde, bewirkte eine Erhöhung der MC2R-Genexpression ($n = 6$). Außerdem ließ sich bei erhöhter ATII-Konzentration ([ATII/C2] = 2500 pg/ml; Zufuhr 1ml/h) eine signifikant stärkere Expression im distalen Bereich verglichen mit dem proximalen Abschnitt messen ($p < 0,0020$, *student's t-test*; $n = 5-7$).

ermittelt werden. Wurde die Angiotensin-II-Konzentration um das Hundertfache erhöht (2500 pg/ml; Zufluss 1 ml/h), sank die MC2R-Genexpression im Vergleich zur Zufuhr von AT II in physiologischen Konzentrationen. Dabei war die Genexpression im distalen Abschnitt signifikant stärker als im proximalen Bereich ($p < 0,002$; Abb. 3.1.2 B).

3.2 Einfluss der in Zellkultur erzeugten Morphogengradienten auf die relative Genexpression des Angiotensin-II-Rezeptors Typ1

Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ1 (AT1R) wird in allen Organen exprimiert, die an der Regulation des Blutdruckes beteiligt sind: Niere, Nebenniere, Blutgefäße, Herz, peripheres und zentrales Nervensystem [104]. In der Nebenniere vermittelt der AT1R die Wirkung von Angiotensin II (Abb. 1.9).

Im Ausgangszustand, also ohne den kontinuierlichen Zufluss von frischem Medium (0 ml/h ZKM) zeigte die Genexpression des Angiotensin-II-Rezeptors Typ1 (AT1R) keinen signifikanten Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich. Wurde 1 ml/h frisches ZKM zugeleitet, stellte sich eine signifikant niedrigere Genexpression im distalen Abschnitt verglichen mit dem proximalen Abschnitt dar ($p < 0,0167$). Bei der Zuleitung von 2 ml

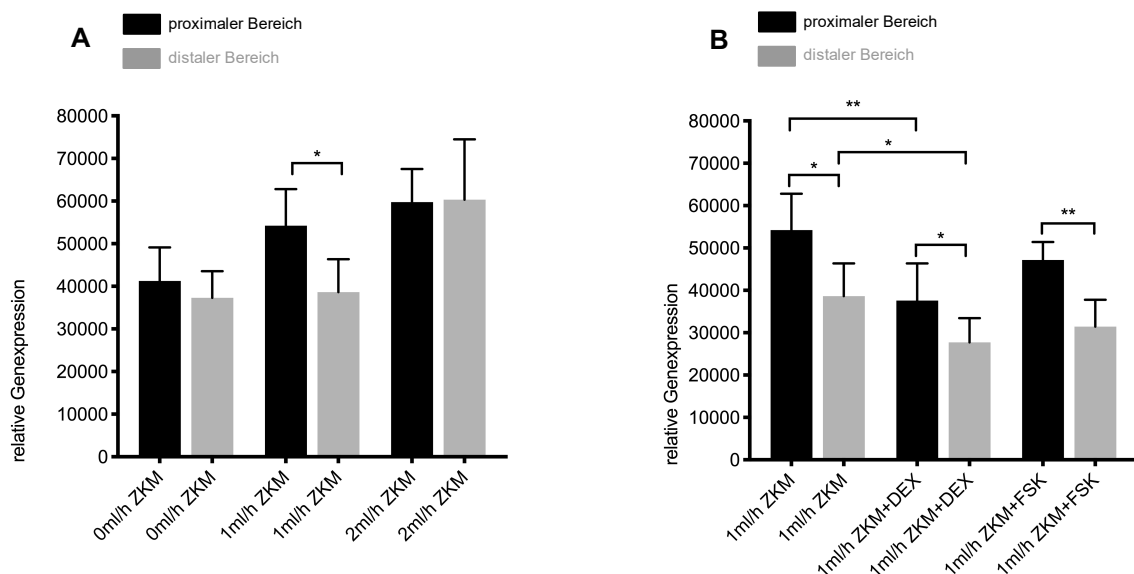


Abb. 3.2.1 A/B: Relative Genexpression des Angiotensin-II-Rezeptors Typ1 (AT1R). (A) Ohne Zufluss von frischem Zellkulturmedium (0 ml/h ZKM) und bei einem Zufluss von 2 ml ZKM pro Stunde (2 ml/h ZKM) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich ($n = 5-7$). Die Zufuhr von 1 ml ZKM pro Stunde (1 ml/h ZKM) bewirkte eine signifikant höhere Genexpression im proximalen Bereich ($p < 0,0167$, *student's t-test*; $n = 5$). (B) Die Zuleitung von ZKM mit zugesetztem Dexamethason ([DEX] = 0,75 μ g/ml; Zufuhr von 1 ml/h) ergab eine signifikant niedrigere Expression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM ($p < 0,0085$, $p < 0,0250$, *student's t-test*). Außerdem stellte sich eine im distalen Abschnitt verminderte Expression im Vergleich zum proximalen Teil dar ($p < 0,0381$, *student's t-test*; $n = 7$). ZKM mit Forskolin ([FSK] = 10 μ M; Zufuhr von 1 ml/h) bewirkte eine signifikant niedrigere Expression im distalen Bereich ($p < 0,0017$, *student's t-test*; $n = 5$).

ZKM pro Stunde erhöhte sich das Expressionsniveau. Jedoch ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich feststellen (Abb. 3.2.1 A).

Wurde dem ZKM Dexamethason zugegeben (Endkonzentration 0,75 µg/ml) und mit 1 ml/h den Zellen zugeleitet, zeigte sich im Vergleich zu 1 ml/h ZKM ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau (proximaler Bereich 1 ml/h ZKM vs. proximaler Bereich 1 ml/h ZKM + DEX: $p < 0,0085$, distaler Bereich 1 ml/h ZKM vs. distaler Bereich ZKM + DEX: $p < 0,0250$). Außerdem stellte sich eine signifikant geringere Expression im distalen Bereich, verglichen mit dem proximalen Bereich, dar ($p < 0,0381$).

Die Beimengung von Forskolin (Endkonzentration 10 µM) bewirkte keine Veränderung des Expressionsniveaus. Die Genexpression war im proximalen Bereich jedoch signifikant stärker, als im distalen Bereich ($p < 0,0017$; Abb. 3.2.1 B).

Unter der kontinuierlichen Zuleitung von 1 ml endothelzellkonditionierten Mediums (30%ig) pro Stunde, stellte sich im Vergleich zu 1 ml/h ZKM, eine tendenziell niedrigeres Expressionsniveau dar. Allerdings muss angemerkt werden, dass hier deskriptive Aussagen nur eingeschränkt möglich sind, da eine zu große Standardabweichung vorliegt. Dabei ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich feststellen (Abb. 3.2.2 A). Die Verwendung von Angiotensin II sowohl in physiologischen als auch in supraphysiologischen Konzentrationen bewirkte weder eine Veränderung des Expressionslevels, noch einen signifikanten Unterschied zwischen dem proximalen und distalen Abschnitt (Abb. 3.2.2 B).

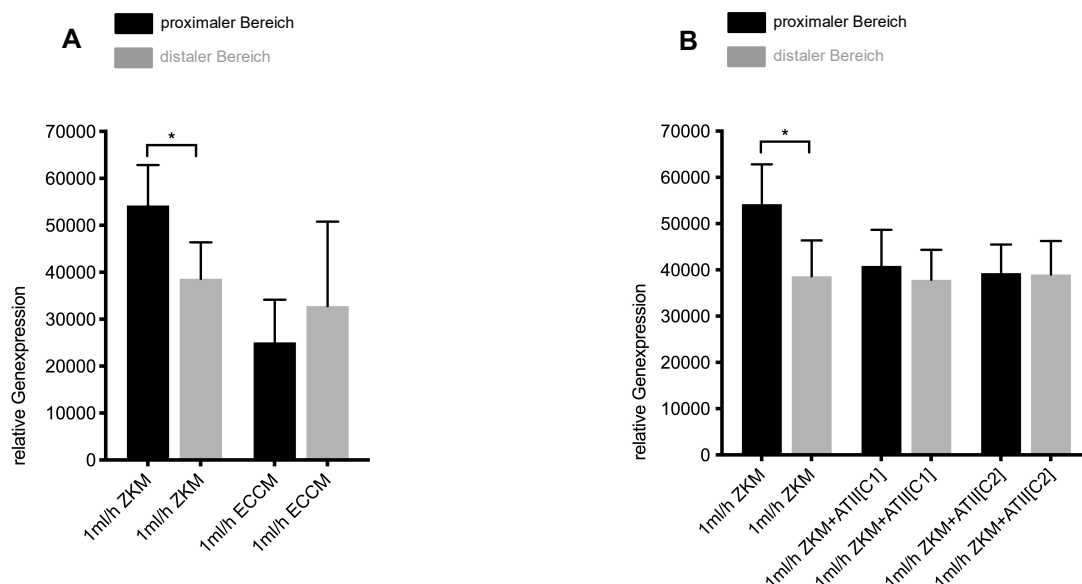


Abb. 3.2.2 A/B: Relative Genexpression des Angiotensin-II-Rezeptors Typ1 (AT1R). (A) Der Zufluss von 1 ml endothelzellkonditioniertem Medium ([ECCM]= 30 %) pro Stunde bewirkte einen leichten Abfall der Expression des AT1R im Vergleich zu 1 ml/h ZKM (n = 5). (B) Die Zuleitung von ZKM mit zugesetztem Angiotensin II ([ATII/C1] = 25 pg/ml; [ATII/C2] = 2500 pg/ml; Zufuhr 1 ml/h) bewirkte keine Veränderung der Genexpression (n = 5-7).

3.3 Einfluss der in Zellkultur erzeugten Morphogengradienten auf die relative Genexpression der Aldosteronsynthese

Die Aldosteronsynthese (CYP11B2) katalysiert die beiden letzten entscheidenden Schritte in der Biosynthese von Aldosteron (Abb.1.3). Dabei verfügt sie über drei unterschiedliche Aktivitäten: die 11 β -Hydroxylase katalysiert die Reaktion von 11-Desoxycorticosteron zu Corticosteron. Anschließend katalysieren die 18-Hydroxylase und die 18-Methyloxidase die Reaktion von Corticosteron zu Aldosteron.

Zunächst zeigte sich im Ausgangszustand, also ohne den Zufluss von frischem Zellkulturmedium (0 ml/h ZKM), ein niedriges Expressionslevel des CYP11B2-Gens. Es konnte kein Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich ermittelt werden. Wurde pro Stunde 1 ml frisches ZKM zugeleitet, erhöhte sich die CYP11B2-Expression stark. Es konnte dabei kein Unterschied zwischen dem proximalen und distalen Abschnitt festgestellt werden. Bei kontinuierlicher Zugabe von 2 ml ZKM pro Stunde (2 ml/h ZKM) sank die Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich (Abb. 3.3.1 A).

Die Zugabe von Dexamethason zum ZKM (Endkonzentration 0,75 μ g/ml, Zufuhr von 1 ml/h) bewirkte eine Erhöhung der Genexpression von CYP11B2 im Vergleich zu 1 ml/h ZKM.

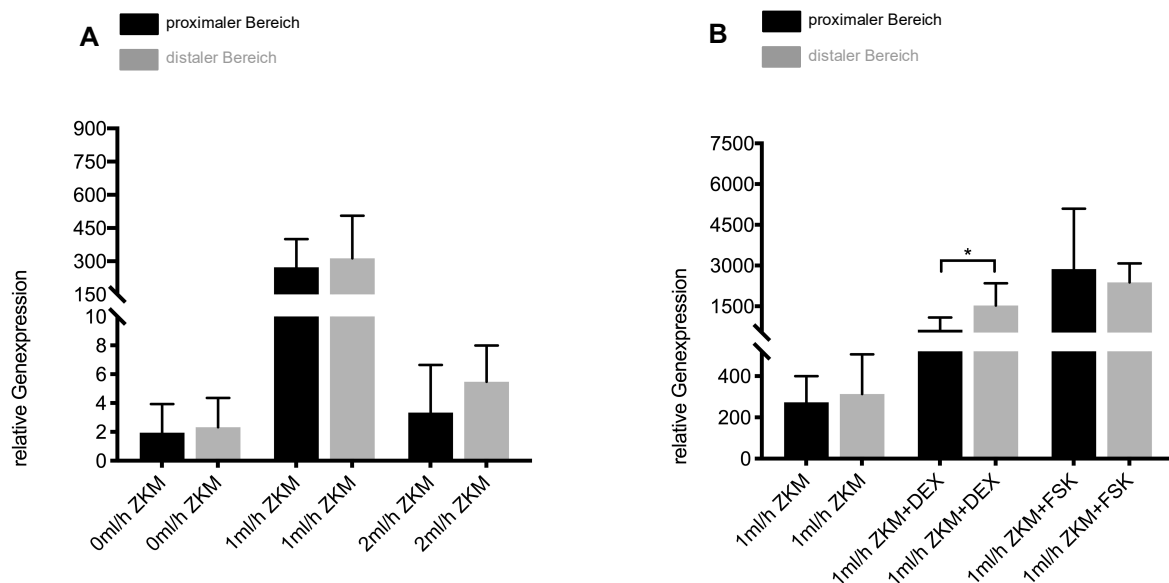


Abb. 3.3.1 A/B: Relative Genexpression der Aldosteronsynthese (CYP11B2). (A) Ohne Zufluss von Zellkulturmedium (0 ml/h ZKM), bei 1 ml ZKM pro Stunde (1 ml/h ZKM) sowie bei Zufluss von 2 ml ZKM pro Stunde (2 ml/h ZKM) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den proximalen und den distalen Bereichen (n = 5-10). (B) Die Zuleitung von 1 ml ZKM pro Stunde, mit zugesetztem Dexamethason ([DEX] = 0,75 μ g/ml) bzw. Forskolin ([FSK] = 10 μ M) pro Stunde, bewirkte eine starke Induktion der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM (n = 6). Die Beimischung von Dexamethason bewirkte eine signifikant höhere CYP11B2-Genexpression im distalen Bereich, verglichen mit dem proximalen (p < 0,0421, *student's t-test*, n = 6).

Hier stellte sich zusätzlich eine signifikant höhere Expression im distalen Bereich, verglichen mit dem proximalen Bereich dar ($p < 0,0421$). Durch das Hinzufügen von Forskolin zum ZKM (Endkonzentration 10 μ M, Zufuhr 1 ml/h) wurde im Vergleich zu den Versuchen mit Dexamethason eine weitere Zunahme der Expression erreicht. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Abschnitt (Abb. 3.3.1 B).

Die Verwendung von endothelzellkonditioniertem Medium (30%ig, Zufuhr 1 ml/h) bewirkte eine starke Erhöhung der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM sowie eine signifikant höhere Genexpression im proximalen Abschnitt, verglichen mit dem distalen ($p < 0,0075$; Abb. 3.3.2 A).

Die Zugabe von Angiotensin II zum ZKM in physiologischen (Endkonzentration 25 pg/ml, Zufuhr 1 ml/h) und supraphysiologischen Konzentrationen (Endkonzentration 2500 pg/ml, Zufuhr 1 ml/h) bewirkte eine Erhöhung der Expression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM. Dabei stellte sich bei der Verwendung supraphysiologischer Konzentrationen eine signifikant stärkere Expression im distalen Abschnitt im Vergleich zum proximalen Bereich dar ($p < 0,0430$; Abb. 3.3.2 B).

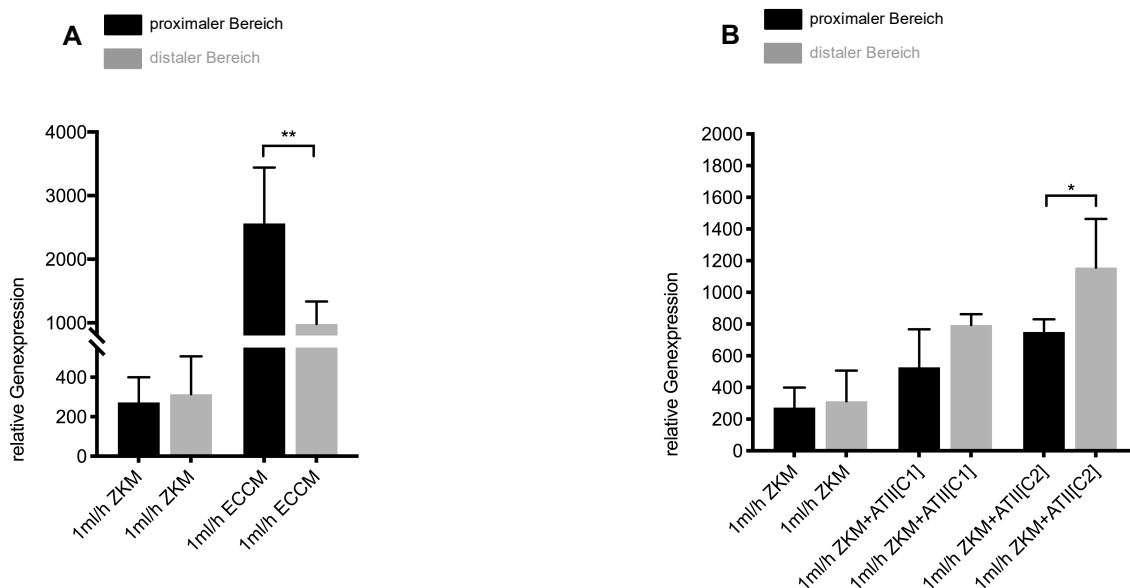


Abb. 3.3.2 A/B: Relative Genexpression der Aldosteronsynthese (CYP11B2). (A) Der Zufluss von 1 ml endothelzellkonditioniertem Medium ([ECCM] = 30%) pro Stunde bewirkte einen starken Anstieg der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM. Außerdem stellte sich eine signifikant höhere Expression im proximalen Bereich, verglichen mit dem distalen, dar ($p < 0,0075$, *student's t-test*; $n = 5$) (B) Die Zuleitung von ZKM mit zugesetztem Angiotensin II (AT II) in verschiedenen Konzentrationen ([ATII/C1] = 25pg/ml), [ATII/C2] = 2500pg/ml, jeweils Zufuhr von 1 ml/h) bewirkte eine Erhöhung des Expressionsniveaus im Vergleich zu 1ml/h ZKM. Bei supraphysiologischen Konzentrationen von ATII ([ATII/C2] = 2500pg/ml) stellte sich eine signifikant stärkere Expression im distalen Abschnitt im Vergleich zum proximalen Bereich dar ($p < 0,0430$, *students t-test*; $n = 5-6$).

3.4 Einfluss der in Zellkultur erzeugten Morphogengradienten auf die relative Genexpression der 11 β -Hydroxylase

Die 11 β -Hydroxylase (CYP11B1) katalysiert den letzten Schritt in der Biosynthese des Cortisols, die Reaktion von Desoxycortisol zu Cortisol [105].

Bei den Untersuchungen zur Genexpression der 11 β -Hydroxylase zeigte sich in den Versuchen ohne Zufuhr frischen Zellkulturmediums (0 ml/h ZKM) ein niedriges Expressionsniveau und kein Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich. Auffällig war, dass die Zuleitung von 1 ml ZKM pro Stunde zwar zu ähnlichen CYP11B1-Genexpressionslevel im proximalen Abschnitt führte, jedoch im distalen Bereich eine signifikant höhere Expression der 11 β -Hydroxylase ermittelt werden konnte ($p < 0,0025$). Die Erhöhung der Zufuhr von frischem ZKM auf 2 ml/h veränderte das Expressionslevel im Vergleich zu 0 ml/h ZKM nicht. Es konnte kein Unterschied zwischen dem distalen und dem proximalen Abschnitt ermittelt werden (Abb. 3.4.1 A). Einschränkend muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass deskriptive Aussagen, aufgrund der Standardabweichung für die Messungen mit 2 ml/h ZKM, nur eingeschränkt möglich sind.

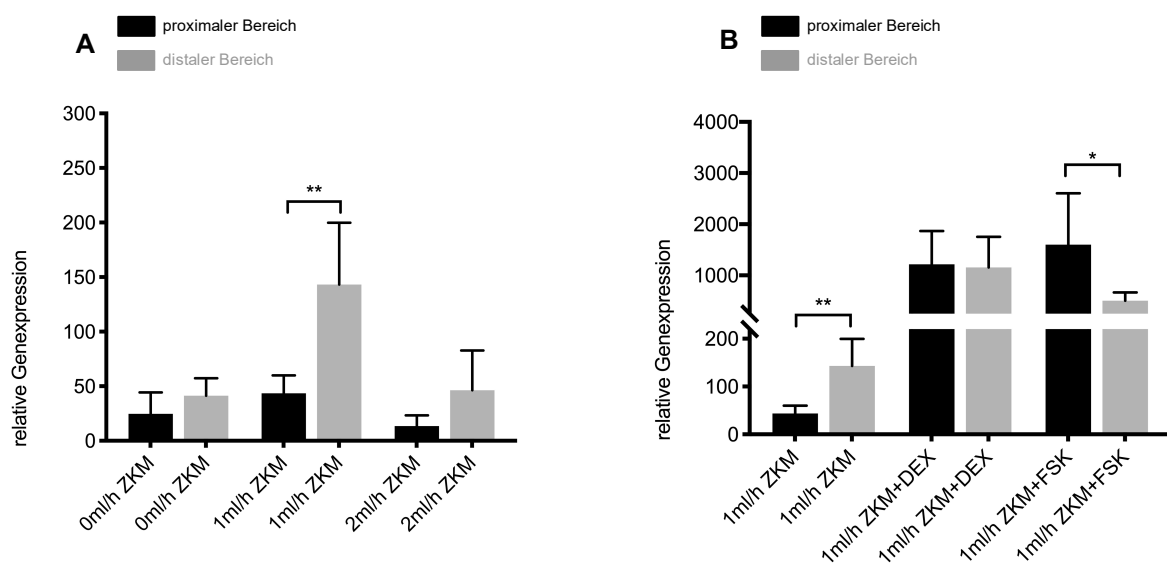


Abb. 3.4.1 A/B: Relative Genexpression der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1). (A) Unter der Zuleitung von 1 ml Zellkulturmedium pro Stunde (1 ml/h ZKM) zeigte sich eine signifikant höhere Expression im distalen Abschnitt verglichen mit dem proximalen Teil ($p < 0,0025$; *student's t-test*; $n = 6$). Ohne den Zufluss von frischem Medium (0 ml/h ZKM) und bei einem Zufluss von 2 ml ZKM pro Stunde (2 ml/h ZKM) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich ($n = 5-9$). (B) Die Zuleitung von ZKM mit zugesetztem Dexamethason ([DEX] = 0,75 μ g/ml, Zufuhr von 1 ml/h) bzw. Forskolin ([FSK] = 10 μ M, Zufuhr von 1 ml/h) bewirkte eine starke Induktion der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM ($n = 6-9$). Die Beimengung von Forskolin bewirkte eine signifikant höhere Expression im proximalen Bereich, im Vergleich zum distalen Bereich ($p < 0,0162$; *student's t-test*).

Die Zufuhr von 1 ml dexamethasonhaltigem ZKM (Endkonzentration 0,75 µg/ml) pro Stunde bewirkte eine starke Erhöhung der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM, jedoch keinen Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich.

Wurde Forskolin zu dem ZKM beigefügt (Endkonzentration 10 µM, Zufuhr von 1ml/h) veränderte sich das Expressionsniveau im Vergleich zu den Versuchen mit Dexamethason nicht. Unter der Zufuhr von Forskolin wurde jedoch eine signifikant stärkere Genexpression im proximalen Abschnitt, verglichen mit dem distalen Bereich, gemessen ($p < 0,0162$, Abb. 3.4.1 B).

Die kontinuierliche Zuleitung von 1 ml endothelzellkonditioniertem Medium (30 %ig) pro Stunde bewirkte eine deutliche Verringerung der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich (Abb.: 3.4.2 A).

Die Zugabe von Angiotensin II zum ZKM, sodass einerseits eine physiologische Endkonzentration von 25 pg/ml, andererseits auch eine supraphysiologische Endkonzentration von 2500 pg/ml erzielt wurde, bewirkte eine Erhöhung der Genexpression im Vergleich zum Zufluss von 1ml/h ZKM. In beiden Fällen zeigte sich kein Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich (Abb. 3.4.2 B).

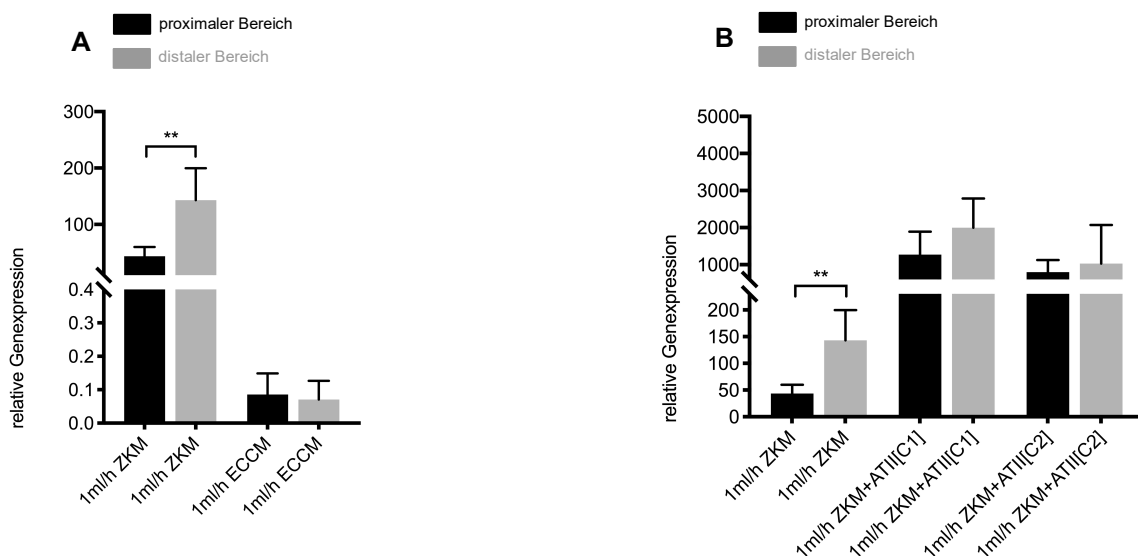


Abb. 3.4.2 A/B: Relative Genexpression der 11β-Hydroxylase (CYP11B1). (A) Der Zufluss von 1 ml endothelzellkonditioniertem Medium ([ECCM]= 30%) pro Stunde bewirkte eine deutliche Verringerung der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM (n = 5). (B) Die Zuleitung von ZKM mit zugesetztem Angiotensin II, sowohl in physiologischen ([ATII/C1]= 25 pg/ml, Zufuhr 1 ml/h), als auch in supraphysiologischen Konzentrationen ([ATII/C2] = 2500 pg/ml, Zufuhr 1 ml/h), führte zu einer starken Erhöhung der CYP11B1-Genexpression (n = 5-6).

3.5 Einfluss der in Zellkultur erzeugten Morphogengradienten auf die relative Genexpression der 17 α -Hydroxylase und der 17,20-Lyase

Das Enzym CYP17A1 ist ein Schlüssel-Enzym in der Steroidbiosynthese (Abb.1.3). Seine 17-Hydroxylase-Aktivität ist wichtig für die Synthese von Glucocorticoiden, während seine 17,20-Lyase-Aktivität essentiell für die Produktion von Androgenen ist [106]. In der Literatur werden die Begriffe CYP17A1 und 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase üblicherweise synonym verwendet. Die Untersuchungen der Genexpression von CYP17A1 zeigten im Ausgangszustand (0 ml/h ZKM) ein hohes Genexpressionsniveau und eine tendenziell höhere Expression im distalen Bereich verglichen mit dem proximalen.

Die kontinuierliche Zugabe von 1 ml ZKM pro Stunde bewirkte eine Verminderung der Genexpression im Vergleich zu 0 ml/h ZKM sowie eine signifikant höhere Expression im distalen Bereich, verglichen mit dem proximalen Abschnitt ($p < 0,0004$). Durch Erhöhung der Zufuhr von frischem ZKM auf 2 ml/h ließ sich ein weiteres Absinken der Genexpression feststellen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem proximalen und distalen Bereich (Abb. 3.5.1 A).

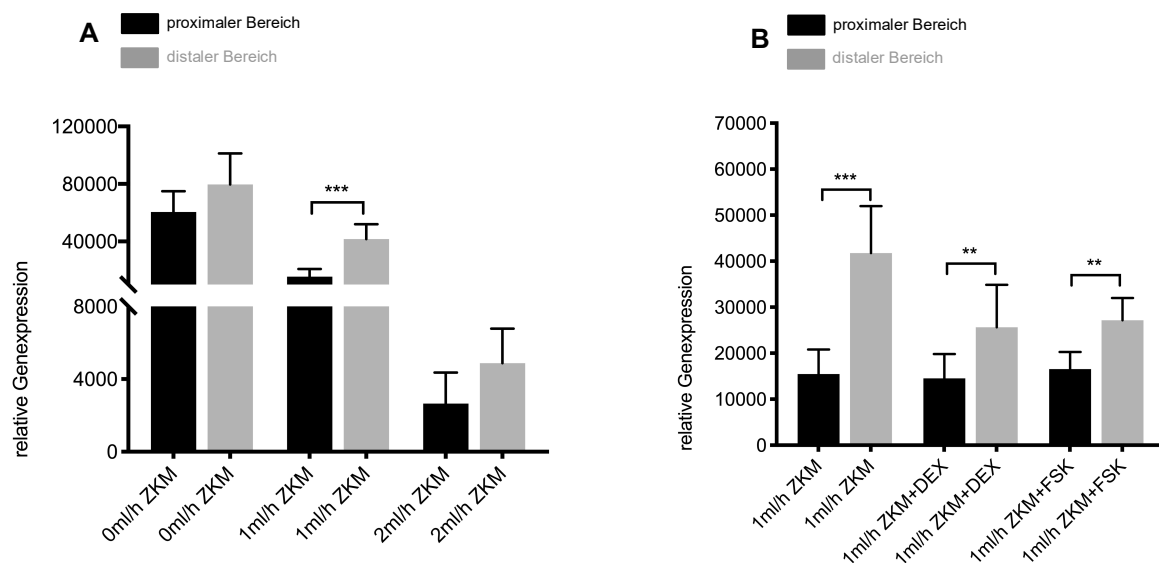


Abb. 3.5.1 A/B: Relative Genexpression der 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17A1). (A) Bei der Zuleitung von 1 ml Zellkulturmedium pro Stunde (1 ml/h ZKM) zeigte sich eine signifikant höhere CYP17A1-Genexpression im distalen Teil verglichen mit dem proximalen Teil ($p < 0,0004$, *student's t-test*; $n = 5-6$). Bei 0 ml/h ZKM war das höchste Genexpressionslevel zu verzeichnen ($n = 8$). (B) Die Zuleitung von ZKM mit zugesetztem Dexamethason ([DEX] = 0,75 μ g/ml, Zufuhr von 1 ml/h) bzw. zugesetztem Forskolin ([FSK] = 10 μ M, Zufuhr von 1 ml/h) bewirkte ein ähnliches Genexpressionsniveau wie die Zufuhr von zu 1 ml/h ZKM ($n = 5-9$). Unter beiden Interventionen wurde eine signifikant höhere Genexpression im distalen Bereich im Vergleich zum proximalen Abschnitt gemessen (Dexamethason $p < 0,0074$; *student's t-test*; Forskolin $p < 0,0046$; *student's t-test*).

Bei der Zugabe von Dexamethason zum ZKM (Endkonzentration 0,75 µg/ml, Zufuhr von 1 ml/h) und auch bei der Zugabe von Forskolin zum ZKM (Endkonzentration 10 µM, Zufuhr von 1 ml/h) ließ sich ein ähnliches Expressionsniveau im Vergleich zu 1 ml/h ZKM feststellen. Beide Interventionen zeigten eine signifikant höhere Expression im distalen Bereich, verglichen mit dem proximalen Bereich (Dexamethason $p < 0,0074$; Forskolin $p < 0,0046$, Abb. 2.5.1 B).

Die Verwendung von endothelzellkonditioniertem Medium (30%ig, Zufuhr 1 ml/h) veränderte die Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM nicht. Dabei wurde ein signifikant höheres Expressionsniveau im distalen Bereich, verglichen mit dem proximalen Abschnitt festgestellt ($p < 0,0008$, Abb. 3.5.2 A). Die Zugabe von Angiotensin II zum ZKM, sowohl im physiologischen (25 pg/ml, Zufuhr 1 ml/h) als auch im supraphysiologischen Maße (2500 pg/ml, Zufuhr 1 ml/h) bewirkte eine tendenzielle Abnahme der Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM. Die Genexpression des distalen Bereiches war unter beiden Interventionen signifikant höher als die des proximalen Bereiches (25 pg/ml: $p < 0,0001$; 2500 pg/ml: $p < 0,0002$; Abb. 3.5.2 B).

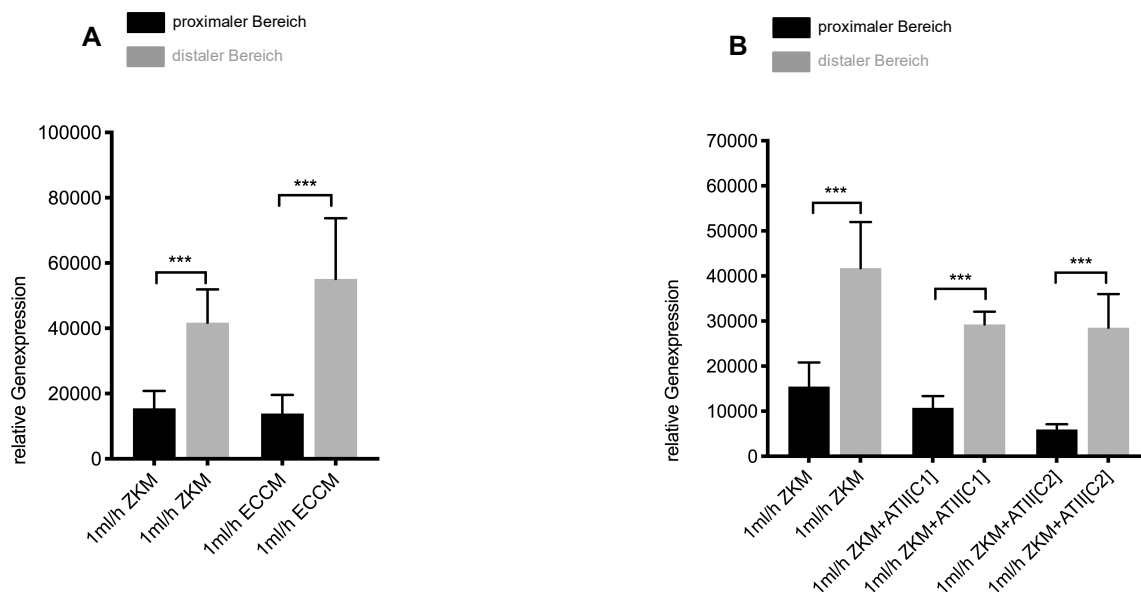


Abb. 3.5.2 A/B: Relative Genexpression der 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17A1). (A) Der Zufluss von 1 ml endothelzellkonditioniertem Medium ([ECCM] = 30%ig) pro Stunde bewirkte eine signifikante Inhibition der Genexpression im proximalen Bereich verglichen mit dem distalen Bereich ($p < 0,0008$, *student's t-test*; $n = 5-6$). (B) Die Zuleitung von ZKM mit zugesetztem Angiotensin II (ATII) in physiologischen ([ATII/C1] = 25 pg/ml, Zufuhr 1 ml/h) und supraphysiologischen Konzentrationen ([ATII/C2] = 2500 pg/ml, Zufuhr 1ml/h), bewirkte ein leichte Reduktion der CYP17A1-Genexpression im Vergleich zu 1 ml/h ZKM. Außerdem zeigte sich unter ATII-Beimengung eine signifikant höhere Genexpression im distalen Bereich im Vergleich zum proximalen Abschnitt (ATII[C1] $p < 0,0001$, ATII[C2] $p < 0,0002$, *student's t-test*; $n = 5$).

4 Diskussion

Die Gliederung der Nebennierenrinde in drei Zonen wurde bereits im Jahre 1866 von Julius Arnold beschrieben [107]. 1883 fand Gottschau erste Hinweise, dass die Zellen der Nebenniere aus dem äußeren Teil der Drüse entstammen, zentripetal migrieren und die verschiedenen Funktionen der einzelnen Zonen nacheinander einnehmen [108]. Somit wurde die Theorie der Zellmigration begründet. Im Laufe der Zeit häuften sich Beobachtungen die diese Theorie stützten bis hin zu Ergebnissen moderner *Genetic-Lineage-Fate-Mapping*-Modellen [78]. In der Mitte des 20. Jahrhunderts wurde bekannt, dass den Zonen der Nebennierenrinde jeweils eine spezifische Funktion zukommt [109]. Die Zellen in jeder Zone produzieren ein spezifisches Spektrum an Steroidhormonen [110, 111]. Weiterhin wurden verschiedene Systeme beschrieben die diese Funktionen regulieren: die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und das RAAS-System wurden entdeckt [112-114]. Grundsätzlich ist die Funktionsweise der Nebennierenrinde gut verstanden. Dennoch ist nicht abschließend geklärt, wie die funktionelle Zonierung der NNR zustande kommt und aufrechterhalten wird. Es stellt sich die Frage woher die Zellen ihre Positionsinformationen beziehen. Gemäß der allgemein anerkannten Theorie der Zellmigration kommt es zu gezielten Veränderungen des Phänotyps der Nebennierenzellen, wobei offen bleibt wie diese reguliert werden. Die Hypothese von Till Dringenberg und Peter Hornsby bietet einen logischen Erklärungsansatz, zur Entstehung der funktionellen Zonierung der Nebennierenrinde und wie die Zellen beim Durchwandern der Rinde ihre Positionsinformationen erhalten und dementsprechend ihre Funktion anpassen. Die Grundlage dieser Theorie ist der Aufbau eines Konzentrationsgradienten und dessen korrekte Ausrichtung entlang des Blutflusses. Dringenberg postulierte, dass die Konzentration von Glucocorticoiden an einer bestimmten Stelle der NNR für die Zellen eine Positionsinformation darstellt. Das Ziel dieser Arbeit war es eine Experimentanordnung zu entwickeln und zu erproben, die einen Blutfluss in Zellkultur simuliert und damit den Aufbau eines Konzentrationsgradienten ermöglicht. Außerdem sollte überprüft werden ob dieser Konzentrationsgradient die Funktion der Zellen ortsabhängig regulieren kann.

Mit der Versuchsreihe, bei der 1 ml Zellkulturmedium pro Stunde in die Zellkulturkammer geleitet wurde, wollten wir prüfen, ob die Zellen ohne jegliche Stimulantien durch ihre eigenen Sekretionsprodukte einen Gradienten aufbauen können, der bereits Auswirkungen auf die Genexpression hat. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich für MC2R, CYP11B1 und CYP17A1 eine signifikant höhere Genexpression im distalen Bereich der Zellkulturflasche verglichen mit dem jeweils proximalen Bereich. Ein umgekehrtes Bild ließ sich für die Genexpression des AT1-Rezeptors beobachten. Bei den Experimenten mit keinem Fluss

(0 ml/h) konnte kein Unterschied in der Expression dieser Gene zwischen den Zonen festgestellt werden.

Es zeigte sich also, dass die verwendete Experimentanordnung eine Veränderung der Genexpression der Zellen im distalen Bereich bewirken konnte und zwar in dem Maße, dass hier mehr Glucocorticoide produziert werden können. Der distale Abschnitt wurde also funktionell in Richtung *Zona fasciculata* verändert. Dies zeigte sich anhand der signifikant niedrigeren Expression des AT1R (Abb. 3.2.1 A), der die Wirkung von Angiotensin II vermittelt und den Signalweg des MC2R hemmt. Auch die signifikant höhere Expression von MC2R (Abb. 3.1.1 A) sowie von CYP11B1 (Abb. 3.4.1 A) und von CYP17A1 (Abb. 3.5.1 A) weisen darauf hin. Denn MC2R (Abb. 3.1.1 A) vermittelt die Wirkung von ACTH, CYP11B1 katalysiert den letzten Schritt der Cortisolsynthese und CYP17A1 ist essentiell für die Bereitstellung der Vorstufen für die Glucocorticoid- und Androgensynthese. Damit bestätigen unsere Ergebnisse die tatsächlich vorherrschenden *in vivo* Verhältnisse und die Hypothese von Hornsby und Dringenberg. Dementsprechend stützen unsere Ergebnisse die Vermutung, dass adrenale Zellen bereits Stoffe sezernieren, welche die Funktion benachbarter Zellen sowie die Gliederung der NNR beeinflussen. An dieser Stelle bleibt offen, welches spezifische Sekretionsprodukt dafür zuständig ist. Darüber lässt sich zu diesem Zeitpunkt nur spekulieren, da die verwendete NCI-H295R-Zelllinie circa 30 verschiedene Steroide sezernieren, darunter sowohl Glucocorticoide als auch Mineralcorticoide und Androgene (2.1.1).

Unter der Annahme, dass die von NCI-H295R-Zellen sezernierten Glucocorticoide durch den künstlich errichteten Fluss kontinuierlich nach distal gedrängt werden, wäre ein Konzentrationsgradient, mit einer erhöhten Konzentration im distalen Bereich denkbar. Dies würde beispielsweise die verminderte Expression des AT1R im distalen Bereich (bei 1 ml/h ZKM) verglichen mit dem proximalen Abschnitt erklären, da der AT1R-Promotor einen Glucocorticoid-sensitiven-Bereich besitzt, der die Expression hemmt [99]. Darin wiederum kann auch die Begründung für die signifikant höhere Genexpression von MC2R, CYP11B1 und CYP17A1 im distalen Abschnitt verglichen mit dem proximalen Bereich liegen. Die verminderte Expression des AT1R bewirkt eine zunehmende Enthemmung des MC2R-Signalweges, wodurch die MC2R-, CYP11B1- und CYP17A1-Genexpression erhöht wird (1.4.2). Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass die Ergebnisse der Versuchsreihe, bei der mit einem Fluss von 1 ml/h ZKM gearbeitet wurde, erstmalig gezielt Daten liefern, die die Hypothese stützen, dass adrenale Zellen durch Sekretion einen Glucocorticoidgradienten aufbauen können, welcher auf die Zonierung der NNR einwirkt.

Bei einer Erhöhung der Flussrate auf 2 ml/h ließ sich bei keinem der untersuchten Gene ein signifikanter Unterschied zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich feststellen. Die Ergebnisse glichen weitgehend der Ausgangssituation, also ohne einen Zufluss von

ZKM (0 ml/h). Vermutlich wird bei einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/h der Konzentrationsgradient der Sekretionsprodukte ausgewaschen bzw. reicht die Sekretionsleistung der Zellen nicht aus, um bei dieser Fließgeschwindigkeit einen Gradienten im Kulturmedium aufzubauen. Auch ließ sich bei einer erhöhten Flussrate von 2 ml/h eine signifikant kleinere Differenz der Glucosekonzentrationen zwischen proximalem und distalem Ende der Zellkulturkammer, im Vergleich zu Flussraten von 0,5 ml/h oder 1 ml/h beobachten. Die Daten der Glucosemessung belegen daher zum einen, dass durch den neuartigen Versuchsaufbau ein Konzentrationsgradient aufgebaut werden kann. Zum anderen, konnte damit gezeigt werden, dass bei zu hohen Flussgeschwindigkeiten (2 ml/h) ein Auswaschen des Gradienten erfolgt. Dementsprechend wurde der Fluss für alle weiteren Versuche auf 1 ml/h festgelegt.

Da laut der Hypothese von Hornsby und Dringenberg der Glucocorticoidgradient eine entscheidende Rolle spielt, führten wir eine Versuchsreihe mit Dexamethason durch, um die Wirkung eines solchen Gradienten zu untersuchen. Die Verwendung von dexamethasonhaltigem ZKM bewirkte eine Induktion der Genexpression von CYP11B2, von CYP11B1 sowie von MC2R (Abb. 3.3.1 B, Abb. 3.4.1 B, Abb. 3.1.1 B). Gemäß der Hornsby-Dringenberg-Hypothese müsste jedoch durch den Einsatz von Glucocorticoiden vermutlich nur die Genexpression von CYP11B1 und MC2R induziert werden, während die von CYP11B2 sinken müsste (Abb. 1.10). Dies ist darin begründet, dass, wie bereits erwähnt, die Expression des AT1-Rezeptors durch Glucocorticoide supprimiert wird [99]. Im Wesentlichen hat dieser Zusammenhang zwei Folgen: Zum einen kann ATII somit nicht mehr an seinen Rezeptor binden, wodurch die Induktion der Genexpression von CYP11B2 entfällt, zum anderen entfällt die AT1R-vermittelte Inhibition des MC2R-Signalweges, was eine Erhöhung der CYP11B1-Expression bewirkt.

Auch unsere Daten zeigten einen Abfall der AT1R-Expression durch Dexamethason im Gegensatz zu den Experimenten mit 1 ml/h ZKM (Abb. 3.2.1 B). Die verstärkte Expression von CYP11B2 zeigte zunächst, dass die Expression dieses Gens noch durch andere Stoffe und Signalwege reguliert wird, was bereits bekannt ist (s.u.). Außerdem ist zu bedenken, dass bei den Versuchen mit Dexamethason dem Medium kein ATII zugesetzt wurde, sodass die verminderte Expression des AT1R auch keine Folgen haben konnte.

Darüber hinaus konnten wir beobachten, dass durch die Verwendung von Dexamethason eine signifikant niedrigere AT1R-Expression im distalen Bereich verglichen mit dem proximalen Bereich bewirkt wurde. Die Ergebnisse für die Aldosteronsynthase (CYP11B2) zeigten ein umgekehrtes Bild. Entgegen der eigentlich zu erwartenden gleichsinnigen Expression von CYP11B2 und AT1-Rezeptor, stellte sich ein konträres Expressionsmuster dar

(Abb. 3.2.1B/Abb. 3.3.1B). Darin ist ein weiterer Hinweis zu sehen, dass einer verminderten Expression des AT1R keine verminderte CYP11B2-Expression folgen muss.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der Versuchsreihe mit Dexamethason einen weiteren Beweis dafür liefern, dass Glucocorticoide die Expression des AT1R hemmen, was wiederum die Bedeutung eines Glucocorticoidgradienten in der Regulation der Zonierung der NNR untermauert (Abb. 4.1). Es zeigte sich jedoch, dass Glucocorticoide die Expression sowohl von CYP11B1 als auch von CYP11B2 induzieren und daher ein Glucocorticoidgradient allein vermutlich nicht die Differenzierung zwischen zG und zF regulieren kann.

Die ebenfalls verstärkte Expression des Melanocortin-2-Rezeptors (Abb. 3.1.1B) durch Dexamethason lässt vermuten, dass Glucocorticoide die Zellen für ACTH sensibilisieren. Um die Wirkung von ACTH auf die Zellen zu simulieren, wurde Forskolin verwendet. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass ACTH Einfluss auf die Entwicklung und Zonierung der NNR nimmt [115]. Außerdem entwickelten Drelon *et al.* eine Hypothese, dass die ACTH-vermittelte Aktivierung des MC2R eine entscheidende Rolle in der Zonierung der NNR, speziell in der Differenzierung zwischen zG und zF, spielt [116]. Denn die Bindung von ACTH an den MC2R löst eine Signalkaskade aus, die mit der Aktivierung der Proteinkinase A einhergeht, welche wiederum die Wnt4-Expression inhibiert [117]. Dadurch wird der Wnt/ β -Catenin-Signalweg gehemmt, dessen Aktivität mit der Funktion der *Zona glomerulosa* assoziiert ist, sodass davon ausgegangen wird, dass ACTH über die Aktivierung der PKA die Funktion der zG hemmt [116, 117] (Abb. 4.1).

Wie zu erwarten war, stellte sich unter dem Einfluss von Forskolin eine Erhöhung der Expression von MC2R und CYP11B1 dar (Abb. 1.9, Abb. 3.1.1B, Abb. 3.4.1B). Die CYP11B1-Genexpression war im proximalen Abschnitt, der durch eine höhere Forskolinkonzentration gekennzeichnet war, signifikant stärker verglichen mit dem distalen Bereich (Abb. 2.1). Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Genexpression wahrscheinlich konzentrationsabhängig erfolgt. Je mehr Forskolin vorhanden ist, desto höher ist die Expression von CYP11B1. Da die Zellen der Nebennierenrinde in der Lage sind, selbst ACTH zu produzieren [42], wird möglicherweise durch einen ähnlichen Mechanismus, wie ihn Dringenberg für die Glucocorticoide beschreibt, auch ein ACTH-Gradient aufgebaut.

Unsere Daten zeigten jedoch auch, dass durch Forskolin CYP11B2 ebenfalls verstärkt exprimiert wird. Dies wurde bereits bei anderen Versuchsreihen mit NCI-H95R-Zellen beobachtet [22]. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei CYP11B1 und CYP11B2 um Isoenzyme handelt, deren Promotoren viele Parallelen aufweisen [83, 118]. So wird sowohl CYP11B1 als auch CYP11B2 durch Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise das *Cyclic-AMP-Response-Element-Binding-Protein* (CREB), den *CRE-Modulator* (CREM) oder den *Activator-Transcription-Factor 2*, hochreguliert [72] (Abb. 1.9/1.8). Sowohl der MC2R-

Signalweg als auch der AT1R-Signalweg erhöht wiederum die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren [72, 84, 88, 93, 94]. Außerdem ist bekannt, dass in der verwendeten Zellreihe eine β -Catenin-Mutation vorliegt, was zu einer erhöhten β -Catenin-Aktivität führt [119]. Möglicherweise liegt darin eine Ursache für die fehlende Reduktion der CYP11B2-Genexpression. Nichtsdestotrotz bestätigen unsere Ergebnisse der Versuchsreihe mit Forskolin die entscheidende Bedeutung der Aktivierung des MC2R-Signalweges und der damit verbundenen PKA-Aktivierung bei der Differenzierung zwischen zG und zF nur teilweise.

In den vergangenen Jahren verdichteten sich die Hinweise, dass die Sekretionsprodukte von Endothelzellen auf die Funktion der adrenalen Zellen einwirken. So konnte eine Vielzahl von experimentellen Untersuchungen zeigen, dass Endothelzellprodukte die Aldosteronproduktion in humanen Nebennierenzellen steigern (34-36, 38). Daher führten wir eine Versuchsreihe mit einem kontinuierlichen Fluss von endothelzellkonditioniertem Medium (ECCM) durch, um zu prüfen, ob ein Konzentrationsgradient der Sekretionsprodukte von Endothelzellen eine ortsabhängige Veränderung in der Genexpression bewirken kann. Bei den durchgeführten Versuchen mit ECCM, konnten wir beobachten, dass ECCM die Expression von CYP11B2 ortsabhängig und damit konzentrationsabhängig erhöht (Abb. 3.3.2 A). Außerdem zeigte sich eine Inhibition der Expression von CYP11B1 (Abb.3.4.2 A). An dieser Stelle bleibt offen, welches Sekretionsprodukt der Endothelzellen dafür verantwortlich ist und welche Signalwege beteiligt sind.

Schwafertz et al. [120] gelang der Nachweis, dass endothelzellkonditioniertes Medium (ECCM) in NCI-H295R-Zellen die β -Catenin-abhängige-Transkription steigert, welche wiederum die Expression von CYP11B2 und CYP11B1 kontrolliert. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert eine Vielzahl von Vorgängen vor allem in der embryologischen Entwicklung, da er vorrangig auf die Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen einwirkt [121]. Wnt-Liganden, wie beispielsweise Wnt4 in der NNR, binden an sog. *Frizzled-Receptors*. Diese Rezeptoren können mit drei verschiedenen Signalwegen assoziiert sein: mit dem kanonischen Signalweg oder mit zwei nicht-kanonischen Signalwegen. Wichtig für die Wirkung in der NNR ist der kanonische Signalweg. Dabei wird durch die Aktivierung des *Frizzled-Receptors* ein intrazellulär lokalisierter Proteinkomplex inhibiert, der normalerweise β -Catenin abbaut. Die Bindung von Wnt-Liganden an ihren Rezeptor führt somit zu einer Akkumulation von β -Catenin, welches im Zellkern an die Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie bindet und diesen ermöglicht, an DNA zu binden [121].

In weiteren Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, dass β -Catenin sowohl die basale als auch die ATII-induzierte Aldosteronsekretion durch Aktivierung der CYP11B2-, AT1R- und CYP21-Transkription steigert [122]. Darüber hinaus wurde in Mausstudien nachgewiesen, dass eine kontinuierliche Aktivierung von β -Catenin zu Hyperaldosteronismus führt [123].

Demgegenüber bewirkte die Inaktivierung von β -Catenin oder von Wnt4 eine Verminderung der CYP11B2-Expression und hatte eine niedrigere Aldosteronproduktion zur Folge [124, 125]. Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zu einer verminderten Corticosteronsekretion durch Senkung der Transkription von CYP11B1, CYP11A1, Star und MC2R führt [126]. Es wird deutlich, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg wahrscheinlich eine sehr wichtige Rolle bei der Zonierung der NNR spielt [116, 127]. Verbindet man nun diese Ergebnisse mit der Beobachtung, dass ECCM die β -Catenin-abhängige-Transkription erhöht [120], lässt sich vermuten, dass unsere Beobachtungen, also die ECCM-vermittelte Induktion von CYP11B2 sowie die Inhibition von CYP11B1 durch ECCM, ebenfalls von dem β -Catenin-Signalweg vermittelt werden.

Schwafertz et al. [120] konnten neben einer Erhöhung der β -Catenin-abhängigen-Transkription durch ECCM zeigen, dass das Ausmaß des Anstieges dieser Transkription abhängig von der Konzentration des ECCM ist. Je höher die Konzentration des ECCM gewählt wurde, desto stärker war Anstieg. Unsere Untersuchungen bestätigen, dass insbesondere die CYP11B2-Genexpression konzentrationsabhängig durch ECCM hochreguliert wird. So zeigte sich eine signifikant höhere Expression von CYP11B2 im proximalen Bereich, der durch eine höhere ECCM-Konzentration gekennzeichnet war (Abb. 3.3.2A). An dieser Stelle stellt sich die Frage welcher Stoff, der von Endothelzellen sezerniert wird und somit in ECCM enthalten ist, die Wirkung auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von NCI-H295R-Zellen mit dem *Basic-Fibroblast-Growth-Factor* (bFGF) den gleichen Effekt auf die β -catenin-abhängigen-Transkription aufweist wie ECCM. Da ECCM bFGF enthält, ist es daher denkbar, dass der Effekt von ECCM auf die β -Catenin-abhängige-Transkription durch bFGF vermittelt wird [120].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse unserer Experimente den Zusammenhang zwischen den Sekretionsprodukten von Endothelzellen und der Wnt/ β -Catenin-abhängigen Regulation der Steroidbiosynthese untermauern. Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass zusätzlich zu dem Glucocorticoidgradienten ein Gradient von Endothelzellprodukten möglich ist, der die Zonierung der NNR reguliert (Abb. 4.1). Dieser müsste entgegengesetzt zu dem Glucocorticoidgradienten wie ihn Dringenberg vorschlägt ausgerichtet sein. Er wäre also durch eine höhere Konzentration im proximalen Bereich (zG) und eine niedrigere Konzentration im distalen Abschnitt (zF) gekennzeichnet (Abb. 1.6). Interessanterweise unterscheidet sich die zG hinsichtlich der Zellmorphologie sowie in der Anordnung der Blutgefäße und damit der Endothelzellen deutlich von der zF. Die Anordnung der Zellen der zG in Nestern, umgeben von einem Kapillarnetz, erinnert an die Glomeruli der Nieren. Demgegenüber sind die Zellen der zF in Strängen angeordnet, die von fenestrierten Blutgefäßen flankiert werden [2, 128, 129]. Durch die netzartige Verzweigung der Blutgefäße

in der zG müsste die Endothelzellmasse in diesem Bereich deutlich höher sein als in der zF. Dieser Unterschied macht einen Gradienten von Endothelzellprodukten durchaus denkbar (Abb. 5.1).

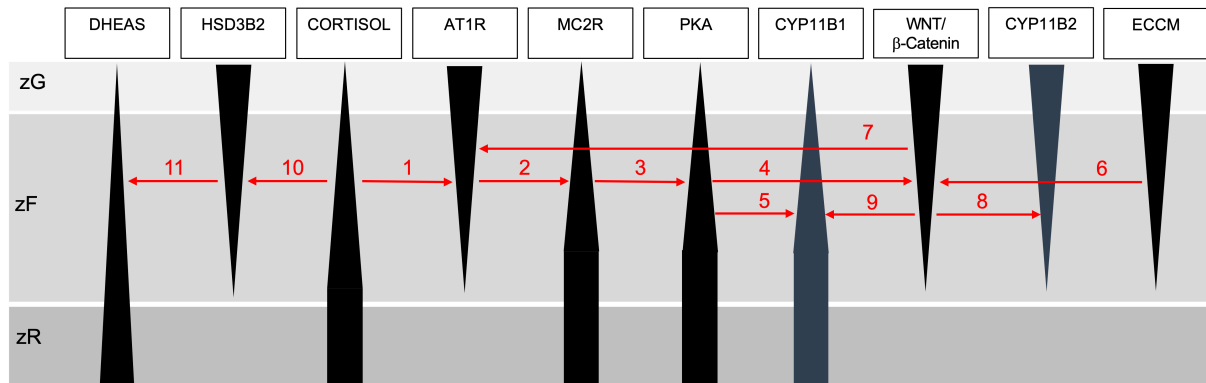


Abb. 4.1: Übersicht über die hypothetische Ausrichtung der Gradienten, welche vermutlich die funktionelle Zonierung der Nebenniere regulieren. (1) Entlang des radiären Blutflusses vom subkapsulär gelegenen arteriellen Gefäßplexus zu den venösen Gefäßen der Medulla kommt es zu einer kontinuierlichen Anreicherung des Blutes mit Glucocorticoiden, sodass ein Konzentrationsgradient entsteht (Dringenberg *et al.*, 2013) [72]. Im peripheren venösen Blut liegt die Konzentration von Cortisol bei ca. 10 - 15 µg/dl, dies entspricht auch der Konzentration im arteriellen Blut. In Proben von Nebennierenvenenkathetern erreicht Cortisol jedoch eine Konzentration von 600-2000 µg/dl (Daten mit freundlicher Genehmigung von H. S. Willenberg). Sowohl unsere Ergebnisse als auch die Daten anderer Forschungsgruppen zeigten, dass Glucocorticoide die Expression des Angiotensin-II-Rezeptor Typ1 (AT1R) hemmen (Bogdarina *et al.*, 2009) [99]. Auch ist bekannt, dass der AT1R in der zG am stärksten exprimiert wird (Schubert *et al.*, 2001) [86]. (2) Der Signalweg des AT1R hemmt den Signalweg des Melanocortin-2-Rezeptors (MC2R) (1.4.2). (3) So folgt auf die zunehmende Hemmung der AT1R-Expression eine zunehmende Enthemmung des Signalweges des MC2R, was eine zunehmende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) bewirkt (Dringenberg *et al.*, 2013) [72]. (4) Die zunehmende Aktivität der PKA hemmt den Wnt/β-Catenin-Signalweg (Drelon *et al.*, 2015, 2016; Finco *et al.*, 2019) [117,116,127]. (5) Außerdem wird durch die zunehmende Aktivität der PKA die Expression von CYP11B1 induziert (Dringenberg *et al.* 2013; Wang *et al.*, 2000) [80,84]. (6) Endothelzellkonditioniertes-Medium (ECCM) induziert die β-Catenin-abhängige-Transkription (Schwarfertz *et al.*, 2017) [120]. Ein Gradient von Sekretionsprodukten ist aufgrund der unterschiedlichen Anordnung der Endothelzellen in der *Zona glomerulosa* (zG) und der *Zona fasciculata* (zF) denkbar. (7/8) Es konnte gezeigt werden, dass der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg die Expression von AT1R und CYP11B2 induziert (Berton *et al.*, 2010,2014; Pignatti *et al.*, 2017) [123,122,129]. (9) Außerdem gibt es Hinweise, dass der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg die Expression von CYP11B1 hemmt (Walczack *et al.*, 2014) [126]. Auch unsere Ergebnisse zeigten eine Induktion der Aldosteronsynthese (CYP11B2) und Inhibition der 11β-Hydroxylase (CYP11B1) durch ECCM. (10/11) Cortisol hemmt die Aktivität der 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 (HSD3B2), wodurch vermehrt Dehydroepiandrosteron (DHEAS) synthetisiert wird (Topor *et al.*,2011) [100].

Der Melanocortin-2-Rezeptor vermittelt die Wirkung von ACTH in der NNR und reguliert daher die Funktion der zF. Da der MC2R in allen Zonen der NNR in ähnlicher Dichte exprimiert wird [82], müssen Mechanismen existieren, welche die Funktion des Rezeptors in der zG und zR hemmen. Dringenberg postuliert, dass der MC2R-Signalweg durch den AT1R-Signalweg in der zG gehemmt wird [72] (Abschnitt 1.4.2). Daher führten wir eine Versuchsreihe durch, bei der der Einfluss einer Aktivierung des AT1R durch einen ATII-Gradienten auf die Genexpression untersucht werden sollte. Dabei zeigte sich wie erwartet eine vermehrte Expression von CYP11B2 und eine unveränderte Expression der AT1R (Abb. 3.3.2 B, Abb. 3.2.2 B). Es stellt sich jedoch auch eine vermehrte Expression von MC2R und CYP11B1 dar (Abb. 3.1.2 B, Abb. 3.4.2 B). Diese vermehrte Genexpression von MC2R und CYP11B1 durch ATII steht im Gegensatz zur AT1R-Signalweg-vermittelten Inhibition des MC2R, wie sie Dringenberg postuliert [72]. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die ATII- und ACTH-Rezeptor-gekoppelten Signalwege sowie ihre Interaktionen nur eine begrenzte Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Expression von CYP11B1 und CYP11B2 in der zG bzw. zF bieten.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass der gerichtete Fluss von Zellkulturmedium einen Gradienten erzeugen kann, wodurch eine Veränderung der Genexpression der verwendeten Zellen in Abhängigkeit von ihrer Position in der Zellkulturflasche erfolgte. Die von Dringenberg postulierte grundlegende Rolle des Glucocorticoidgradienten lässt sich mit den Ergebnissen unserer Experimente nur eingeschränkt bestätigen. Auch Hornsby spricht in seiner Veröffentlichung von dem Gradienten „eines“ Morphogens [71].

Unsere Ergebnisse machen jedoch ein Zusammenspiel verschiedener Gradienten, welche jeweils unterschiedlich ausgerichtet sind, wahrscheinlich. Beispielsweise ist ein Glucocorticoidgradient denkbar, der durch niedrige Konzentrationen im Bereich der *Zona glomerulosa* sowie durch hohe Konzentrationen in der *Zona fasciculata* und der *Zona reticularis* gekennzeichnet ist. Mit steigender Glucocorticoid-Konzentration kommt es so zu einer zunehmenden Desensibilisierung der Zellen für ATII, da der AT1R zunehmend vermindert exprimiert wird (Abb. 3.2.1 B, Abb. 5.1). Dies hat zur Folge, dass der Signalweg des MC2R enthemmt wird und vermehrt CYP11B1 exprimiert wird (Abb. 3.4.1 B). Dem Glucocorticoidgradienten könnte ein Gradient von Endothelzellprodukten gegenübergestellt sein, welcher durch die unterschiedliche Anordnung der Blutgefäße und damit der Endothelzellen in den Zonen der NNR zustande kommt. Dieser Gradient von Endothelzellprodukten wäre durch eine höhere Konzentration in der *Zona glomerulosa* und geringere Konzentrationen in der *Zona fasciculata* sowie der *Zona reticularis* charakterisiert. Dabei wird in der zG durch die vermehrte β -Catenin-Aktivität verstärkt CYP11B2 exprimiert und CYP11B1 supprimiert.

Zur genaueren Untersuchung, ob Konzentrationsgradienten zur Differenzierung der NNR beitragen, sind in Zukunft weitere Experimente zunächst mit primären Zellen notwendig. Bei NCI-H295R-Zellen handelt es sich um Tumorzellen, die über verschiedene Mutationen verfügen. Dadurch sind nur eingeschränkt Aussagen über die Verhältnisse *in vivo* möglich. Außerdem sind künftig Experimente notwendig, bei denen eine klarere Ursache-Wirkungs-Beziehung hergestellt werden kann. Dies könnte beispielweise durch die getrennte Inkubation von Nebennierenzellen mit steigender Konzentration von ECCM und Glucocorticoiden mit anschließender Analyse der Sekretionsprodukte durch Immunassays wie ELISA gelingen. Nachfolgend könnte die Expressionsanalyse entscheidender Gene wie AT1R, MC2R, CYP11B1, CYP11B2, HSD3B2 und CYP17A1 durch qPCR erfolgen.

5 Anhang

5.1 Ergänzende Graphen

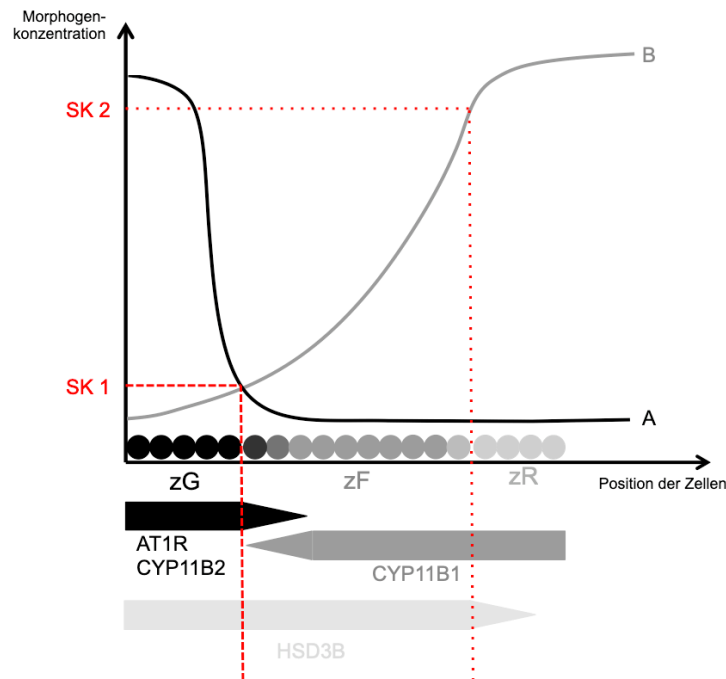


Abb. 5.1.: Skizze des Glucocorticoidgradienten und eines möglichen Endothelzellprodukt-Gradienten. Im Bereich der zG kommt es aufgrund des morphologischen Unterschiedes zur zF (mehr Endothelzellen in der zG) zu einer verstärkten Sekretion von Endothelzellprodukten (Graph A). Diese induzieren über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Genexpression von CYP11B2 und bewirken damit eine verstärkte Aldosteronsynthese. Durch das Absinken der Endothelzellproduktkonzentration unter eine bestimmte Schwellenkonzentration (SK1) bzw. aufgrund des Überschreitens der SK1 durch Glucocorticoide kommt es zu einer Veränderung des Genexpressionsmusters in den Zellen. Bereits Zellen der zG sezernieren Glucocorticoide. Durch den Blutfluss werden diese in Richtung der zF geleitet. Der stetige Anstieg der Glucocorticoidkonzentration bewirkt im Bereich der zF durch die Hemmung des AT1R und der damit verbundenen Enthemmung des MC2R-Signalweges einem exponentiellen Anstieg der Glucocorticoidkonzentration (Graph B). Überschreitet die Konzentration von Glucocorticoiden eine gewisse Schwelle (SK2), ändert sich abermals das Expressionsmuster der Zellen.

5.2 Material

5.2.1 Chemikalien und Fertiglösungen

Produkt	Hersteller
Angiotensin II human	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Roti®-Cell DMEM F12	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Cell PBS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Endothelial Cell Growth Supplement	Corning Inc., Corning, USA
FBS Good Forte	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Trypsin EDTA 0,25%	Gibco by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA
ITS + Premix	Corning Inc., Corning, USA
F-12K Medium	ATCC, Manassas, USA
Forskolin BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Penicillin+Streptomycin	Gibco by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heparin Sodium Salt	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TE-Buffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland

5.2.2 Kits

Produkt	Hersteller
HS MC2R QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
HS AGTR1 QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
HS CYP17A1 QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
HS CYP11B1 QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
HS CYP11B2 QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini-Kit®	Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAshredder®	Qiagen, Hilden, Deutschland
T-Primed First-Strand-Kit	GE Healthcare, Chicago, USA
qPCR Myxplasma Test Kit	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

5.2.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Cellstar-Zellkulturflaschen 250 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Objekträgerflasche	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 2ml/5ml/10ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Perfusor-Verlängerungsleitung	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Perfusor Syringe 50ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
CellStar-Zellschaber	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar-Tubes 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Reagiergefäße 1,5 ml EASY CAP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen RNA-frei	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
BD Microlance TM 3	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Pasteurpipetten	Fisher Scientific Inc., Waltham USA
Filtropur S 0,45 Sarstedt	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Hard-Shell® 96-Well PCR Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, USA
Verschlussfolie Mikrotiterplatten Microseal®	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, USA

5.2.4 Geräte

Produkt	Hersteller
C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, USA
BioSpectrometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ThermoMixer C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
MicroStar 12	VWR International, Radnor, USA

MegaStar 600R	VWR International, Radnor, USA
Perfusor ® compact	B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland
Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
Safeflow 1.2 Sterilbank	Nunc™ by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA
Hera Cell 150 Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA
Akkuschrauber	Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland
Vacusafe	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
Mikroskop Leica DMI1	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
µCuvette G1.0	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten (0,5-1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glucosesensor GlucoCheck	Aktivmed GmbH, Rheine, Deutschland
Glucosesensor Dexcom G6	Dexcom Deutschland GmbH, Mainz, Deutschland

5.2.5 Software

Produkt	Hersteller	Verwendungszweck
Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA	Statistische Analyse / Graphen
Bio-Rad CFX Manager	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, USA	Programmierung qPCR / Ermittlung Ct-Werte
Microsoft Word: mac 2019	Microsoft, Redmond, USA	Dissertationsschrift
Microsoft Excel: mac 2019	Microsoft, Redmond, USA	Datenauswertung
Microsoft PowerPoint: mac 2019	Microsoft, Redmond, USA	Abbildungen/Diagramme
Endnote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA	Zitierprogramm
MedCalc 19.4	MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium	Datenauswertung

6 Literaturverzeichnis

1. Willenberg HS, Bornstein SR. Adrenal Cortex; Development, Anatomy, Physiology. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA)2000.
2. Lüllmann-Rauch R AE. Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag KG 2019;6:520-4.
3. Lumbers ER. Angiotensin and aldosterone. Regul Pept. 1999;80(3):91-100.
4. Tanabe A, Naruse M, Arai K, Naruse K, Yoshimoto T, Seki T, et al. Angiotensin II stimulates both aldosterone secretion and DNA synthesis via type 1 but not type 2 receptors in bovine adrenocortical cells. J Endocrinol Invest. 1998;21(10):668-72.
5. Willenberg HS, Bornstein SR, Hiroi N, Path G, Goretzki PE, Scherbaum WA, et al. Effects of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type I antagonist on human adrenal function. Mol Psychiatry. 2000;5(2):137-41.
6. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. Endocr Rev. 1998;19(2):101-43.
7. Gallo-Payet N, Pothier P, Isler H. On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex: their possible role in adrenocortical function. Biochem Cell Biol. 1987;65(6):588-92.
8. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Usadel H, Bockmann M, Scherbaum WA. Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. Cell Tissue Res. 1991;265(1):1-9.
9. Bornstein SR, Gonzalez-Hernandez JA, Ehrhart-Bornstein M, Adler G, Scherbaum WA. Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. J Clin Endocrinol Metab. 1994;78(1):225-32.
10. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Ultrastructural evidence for a paracrine regulation of the rat adrenal cortex mediated by the local release of catecholamines from chromaffin cells. Endocrinology. 1992;131(6):3126-8.
11. Hervonen A, Linnoila I, Vaalasti A, Alho H, Peltto-Huikko M. Electron microscopic localization of enkephalin-like immunoreactivity in the human adrenal medulla. J Electron Microsc Tech. 1989;12(4):380-8.
12. Gamse R, Saria A, Bucsics A, Lembeck F. Substance P in tumors: pheochromocytoma and carcinoid. Peptides. 1981;2 Suppl 2:275-80.
13. Linnoila RI, Diaugustine RP, Hervonen A, Miller RJ. Distribution of [Met5]- and [Leu5]-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. Neuroscience. 1980;5(12):2247-59.

14. Osamura RY, Tsutsumi Y, Yanaihara N, Imura H, Watanabe K. Immunohistochemical studies for multiple peptide-immunoreactivities and co-localization of Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8, neuropeptide Y and somatostatin in human adrenal medulla and pheochromocytomas. *Peptides*. 1987;8(1):77-87.
15. Bornstein SR, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M. Cellular communication in the neuro-adrenocortical axis: role of vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Endocr Res*. 1996;22(4):819-29.
16. Vinson GP, Hinson JP, Toth IE. The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol*. 1994;6(3):235-46.
17. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF, Holst JJ. Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology*. 1990;127(2):900-6.
18. Holzwarth MA, Cunningham LA, Kleitman N. The role of adrenal nerves in the regulation of adrenocortical functions. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;512:449-64.
19. Hinson JP. Paracrine control of adrenocortical function: a new role for the medulla? *J Endocrinol*. 1990;124(1):7-9.
20. Vizi ES, Toth IE, Orso E, Szalay KS, Szabo D, Baranyi M, et al. Dopamine is taken up from the circulation by, and released from, local noradrenergic varicose axon terminals in zona glomerulosa of the rat: a neurochemical and immunocytochemical study. *J Endocrinol*. 1993;139(2):213-26.
21. Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Willenberg HS. Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;265-266:150-6.
22. Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Willenberg HS, Krug AW, Funk RH, et al. Vascular-adrenal niche--endothelial cell-mediated sensitization of human adrenocortical cells to angiotensin II. *Horm Metab Res*. 2006;38(7):476-80.
23. Ansurudeen I, Willenberg HS, Kopprasch S, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Endothelial factors mediate aldosterone release via PKA-independent pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;300(1-2):66-70.
24. Haase M, Ansurudeen I, Schinner S, Paramonova I, Schott M, Papewalis C, et al. Evidence for the involvement of endothelial cell products in adrenal CITED2 expression. *Cell Tissue Res*. 2009;336(2):337-43.
25. Rosolowsky LJ, Campbell WB. Endothelial cells stimulate aldosterone release from bovine adrenal zona glomerulosa cells. *Am J Physiol*. 1994;266(1 Pt 1):E107-17.
26. Paramonova I, Haase M, Mulders-Opgenoorth B, Ansurudeen-Rafi I, Bornstein SR, Papewalis C, et al. The effects of the endothelium on adrenal steroidogenesis and growth are mainly mediated by proteins other than endothelin-1. *Horm Metab Res*. 2010;42(12):840-5.

27. Hinson JP, Vinson GP, Kapas S, Teja R. The role of endothelin in the control of adrenocortical function: stimulation of endothelin release by ACTH and the effects of endothelin-1 and endothelin-3 on steroidogenesis in rat and human adrenocortical cells. *J Endocrinol.* 1991;128(2):275-80.
28. Nussdorfer GG, Rossi GP, Belloni AS. The role of endothelins in the paracrine control of the secretion and growth of the adrenal cortex. *Int Rev Cytol.* 1997;171:267-308.
29. Gonzalez-Hernandez JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Geschwend JE, Adler G, Scherbaum WA. Macrophages within the human adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 1994;278(2):201-5.
30. Hume DA, Halpin D, Charlton H, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(13):4174-7.
31. Gonzalez-Hernandez JA, Ehrhart-Bornstein M, Spath-Schwalbe E, Scherbaum WA, Bornstein SR. Human adrenal cells express tumor necrosis factor-alpha messenger ribonucleic acid: evidence for paracrine control of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(2):807-13.
32. Gonzalez-Hernandez JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Spath-Schwalbe E, Jirikowski G, Scherbaum WA. Interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression in human adrenal gland in vivo: new clue to a paracrine or autocrine regulation of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79(5):1492-7.
33. Gonzalez-Hernandez JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Gschwend JE, Gwosdow A, Jirikowski G, et al. IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clin Exp Immunol.* 1995;99(1):137-41.
34. Path G, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: expression and effects on steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(7):2343-9.
35. Path G, Bornstein SR, Spath-Schwalbe E, Scherbaum WA. Direct effects of interleukin-6 on human adrenal cells. *Endocr Res.* 1996;22(4):867-73.
36. Gwosdow AR, O'Connell NA, Spencer JA, Kumar MS, Agarwal RK, Bode HH, et al. Interleukin-1-induced corticosterone release occurs by an adrenergic mechanism from rat adrenal gland. *Am J Physiol.* 1992;263(3 Pt 1):E461-6.
37. Tominaga T, Fukata J, Naito Y, Usui T, Murakami N, Fukushima M, et al. Prostaglandin-dependent in vitro stimulation of adrenocortical steroidogenesis by interleukins. *Endocrinology.* 1991;128(1):526-31.
38. Andreis PG, Neri G, Meneghelli V, Mazzocchi G, Nussdorfer GG. Effects of interleukin-1 beta on the renin-angiotensin-aldosterone system in rats. *Res Exp Med (Berl).* 1992;192(1):1-6.

39. Natarajan R, Ploszaj S, Horton R, Nadler J. Tumor necrosis factor and interleukin-1 are potent inhibitors of angiotensin-II-induced aldosterone synthesis. *Endocrinology*. 1989;125(6):3084-9.
40. Andreis PG, Neri G, Mazzocchi G, Musajo F, Nussdorfer GG. Direct secretagogue effect of corticotropin-releasing factor on the rat adrenal cortex: the involvement of the zona medullaris. *Endocrinology*. 1992;131(1):69-72.
41. Andreis PG, Neri G, Nussdorfer GG. Corticotropin-releasing hormone (CRH) directly stimulates corticosterone secretion by the rat adrenal gland. *Endocrinology*. 1991;128(2):1198-200.
42. Lotfi CFP, Kremer JL, Dos Santos Passaia B, Cavalcante IP. The human adrenal cortex: growth control and disorders. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73(suppl 1):e473s.
43. Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H, Shizume K. Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;59(5):861-6.
44. Suda T, Tomori N, Yajima F, Odagiri E, Demura H, Shizume K. Characterization of immunoreactive corticotropin and corticotropin-releasing factor in human adrenal and ovarian tumours. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1986;111(4):546-52.
45. Bruhn TO, Engeland WC, Anthony EL, Gann DS, Jackson IM. Corticotropin-releasing factor in the dog adrenal medulla is secreted in response to hemorrhage. *Endocrinology*. 1987;120(1):25-33.
46. Edwards AV, Jones CT. Secretion of corticotrophin releasing factor from the adrenal during splanchnic nerve stimulation in conscious calves. *J Physiol*. 1988;400:89-100.
47. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Rebuffat P, Tortorella C, Nussdorfer GG. Arginine-vasopressin stimulates CRH and ACTH release by rat adrenal medulla, acting via the V1 receptor subtype and a protein kinase C-dependent pathway. *Peptides*. 1997;18(2):191-5.
48. Mazzocchi G, Musajo FG, Malendowicz LK, Andreis PG, Nussdorfer GG. Interleukin-1 β Stimulates Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) and Adrenocorticotropin (ACTH) Release by Rat Adrenal Gland in Vitro. *Mol Cell Neurosci*. 1993;4(3):267-70.
49. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Rebuffat P, Gottardo G, Nussdorfer GG. Neurotensin stimulates CRH and ACTH release by rat adrenal medulla in vitro. *Neuropeptides*. 1997;31(1):8-11.
50. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006;86(3):747-803.
51. Mizuno K. Renin in adrenal: an overview of its synthesis, subcellular localization, and functions. *Fukushima J Med Sci*. 1991;37(2):41-57.
52. Ryan JW. Renin-like enzyme in the adrenal gland. *Science*. 1967;158(3808):1589-90.

53. Racz K, Pinet F, Gasc JM, Guyene TT, Corvol P. Coexpression of renin, angiotensinogen, and their messenger ribonucleic acids in adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75(3):730-7.
54. Sarzani R, Fallo F, Dessi-Fulgheri P, Pistorello M, Lanari A, Paci VM, et al. Local renin-angiotensin system in human adrenals and aldosteronomas. *Hypertension.* 1992;19(6 Pt 2):702-7.
55. Kifor I, Moore TJ, Fallo F, Sperling E, Chiou CY, Menachery A, et al. Potassium-stimulated angiotensin release from superfused adrenal capsules and enzymatically dispersed cells of the zona glomerulosa. *Endocrinology.* 1991;129(2):823-31.
56. Bandulik S, Tauber P, Penton D, Schweda F, Tegtmeier I, Sterner C, et al. Severe hyperaldosteronism in neonatal Task3 potassium channel knockout mice is associated with activation of the intraadrenal renin-angiotensin system. *Endocrinology.* 2013;154(8):2712-22.
57. Oda N, Takeda Y, Zhu A, Usukura M, Yoneda T, Takata H, et al. Pathophysiological roles of the adrenal renin-angiotensin system in patients with primary aldosteronism. *Hypertens Res.* 2006;29(1):9-14.
58. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1997;18(3):378-403.
59. Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(5):200-8.
60. McNutt NS, Jones AL. Observations on the ultrastructure of cytodifferentiation in the human fetal adrenal cortex. *Lab Invest.* 1970;22(6):513-27.
61. Dupont E, Luu-The V, Labrie F, Pelletier G. Light microscopic immunocytochemical localization of 3 beta-hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in the gonads and adrenal glands of the guinea pig. *Endocrinology.* 1990;126(6):2906-9.
62. Parker CR, Jr., Faye-Petersen O, Stankovic AK, Mason JI, Grizzle WE. Immunohistochemical evaluation of the cellular localization and ontogeny of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-4 isomerase in the human fetal adrenal gland. *Endocr Res.* 1995;21(1-2):69-80.
63. Mesiano S, Coulter CL, Jaffe RB. Localization of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17, 20-lyase, and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase steroidogenic enzymes in human and rhesus monkey fetal adrenal glands: reappraisal of functional zonation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(5):1184-9.
64. Breault L, Lehoux JG, Gallo-Payet N. The angiotensin AT2 receptor is present in the human fetal adrenal gland throughout the second trimester of gestation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(11):3914-22.

65. Doody KM, Carr BR, Rainey WE, Byrd W, Murry BA, Strickler RC, et al. 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in the fetal zone and neocortex of the human fetal adrenal gland. *Endocrinology*. 1990;126(5):2487-92.
66. Coulter CL, Jaffe RB. Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology*. 1998;139(12):5144-50.
67. Lalli E. Adrenal cortex ontogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(6):853-64.
68. Johannisson E. The foetal adrenal cortex in the human. Its ultrastructure at different stages of development and in different functional states. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1968;58:Suppl 130:7+.
69. Sucheston ME, Cannon MS. Development of zonular patterns in the human adrenal gland. *J Morphol*. 1968;126(4):477-91.
70. Hornsby PJ. Aging of the human adrenal cortex. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2004;2004(35):re6.
71. Hornsby PJ. Adrenarche: a cell biological perspective. *J Endocrinol*. 2012;214(2):113-9.
72. Dringenberg T, Schwitalla M, Haase M, Scherbaum WA, Willenberg HS. Control of CYP11B2/CYP11B1 expression ratio and consequences for the zonation of the adrenal cortex. *Horm Metab Res*. 2013;45(2):81-5.
73. Skelton FR. A study of the natural history of adrenal-regeneration hypertension. *Circ Res*. 1959;7(1):107-17.
74. Perrone RD, Bengel HH, Alexander EA. Sodium retention after adrenal enucleation. *Am J Physiol*. 1986;250(1 Pt 1):E1-12.
75. Chang SP, Morrison HD, Nilsson F, Kenyon CJ, West JD, Morley SD. Cell proliferation, movement and differentiation during maintenance of the adult mouse adrenal cortex. *PLoS One*. 2013;8(12):e81865.
76. Lombardo LD, Cortesini C. The origin and differentiation of adrenocortical cells in rats with portacaval shunt. A structural and ultrastructural study. *Histol Histopathol*. 1988;3(2):163-71.
77. Zajicek G, Ariel I, Arber N. The streaming adrenal cortex: direct evidence of centripetal migration of adrenocytes by estimation of cell turnover rate. *J Endocrinol*. 1986;111(3):477-82.
78. Huang CC, Miyagawa S, Matsumaru D, Parker KL, Yao HH. Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology*. 2010;151(3):1119-28.

79. Lander AD. How cells know where they are. *Science*. 2013;339(6122):923-7.
80. Brabletz S, Schmalhofer O, Brabletz T. Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J Pathol*. 2009;217(2):307-17.
81. Novoselova TV, Jackson D, Campbell DC, Clark AJ, Chan LF. Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal gland physiology and beyond. *J Endocrinol*. 2013;217(1):R1-11.
82. Reincke M, Beuschlein F, Menig G, Hofmockel G, Arlt W, Lehmann R, et al. Localization and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex. *J Endocrinol*. 1998;156(3):415-23.
83. Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE. Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol*. 2002;28(2):125-35.
84. Wang XL, Bassett M, Zhang Y, Yin S, Clyne C, White PC, et al. Transcriptional regulation of human 11beta-hydroxylase (hCYP11B1). *Endocrinology*. 2000;141(10):3587-94.
85. Winnay JN, Hammer GD. Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol*. 2006;20(1):147-66.
86. Schubert B, Fassnacht M, Beuschlein F, Zenkert S, Allolio B, Reincke M. Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;54(5):627-32.
87. Hausdorff WP, Sekura RD, Aguilera G, Catt KJ. Control of aldosterone production by angiotensin II is mediated by two guanine nucleotide regulatory proteins. *Endocrinology*. 1987;120(4):1668-78.
88. Sackmann S, Lichtenauer U, Shapiro I, Reincke M, Beuschlein F. Aldosterone producing adrenal adenomas are characterized by activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) dependent pathways. *Horm Metab Res*. 2011;43(2):106-11.
89. Edwards RM, Stack EJ. Angiotensin II inhibits glomerular adenylate cyclase via the angiotensin II receptor subtype 1 (AT1). *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;266(2):506-10.
90. Bassett MH, White PC, Rainey WE. The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;217(1-2):67-74.
91. Sirianni R, Nogueira E, Bassett MH, Carr BR, Suzuki T, Pezzi V, et al. The AP-1 family member FOS blocks transcriptional activity of the nuclear receptor steroidogenic factor 1. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 22):3956-65.

92. Condon JC, Pezzi V, Drummond BM, Yin S, Rainey WE. Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology*. 2002;143(9):3651-7.
93. Matthews RP, Guthrie CR, Wailes LM, Zhao X, Means AR, McKnight GS. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol Cell Biol*. 1994;14(9):6107-16.
94. Nogueira EF, Rainey WE. Regulation of aldosterone synthase by activator transcription factor/cAMP response element-binding protein family members. *Endocrinology*. 2010;151(3):1060-70.
95. Nogueira EF, Xing Y, Morris CA, Rainey WE. Role of angiotensin II-induced rapid response genes in the regulation of enzymes needed for aldosterone synthesis. *J Mol Endocrinol*. 2009;42(4):319-30.
96. Bassett MH, White PC, Rainey WE. A role for the NGFI-B family in adrenal zonation and adrenocortical disease. *Endocr Res*. 2004;30(4):567-74.
97. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE. The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol*. 2004;18(2):279-90.
98. Hornsby PJ. Physiological and pathological effects of steroids on the function of the adrenal cortex. *J Steroid Biochem*. 1987;27(4-6):1161-71.
99. Bogdarina IG, King PJ, Clark AJ. Characterization of the angiotensin (AT1b) receptor promoter and its regulation by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol*. 2009;43(2):73-80.
100. Topor LS, Asai M, Dunn J, Majzoub JA. Cortisol stimulates secretion of dehydroepiandrosterone in human adrenocortical cells through inhibition of 3 β HSD2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):E31-9.
101. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, et al. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res*. 1990;50(17):5488-96.
102. Nanba K, Chen AX, Turcu AF, Rainey WE. H295R expression of melanocortin 2 receptor accessory protein results in ACTH responsiveness. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(2):69-76.
103. Gallo-Payet N. 60 YEARS OF POMC: Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(4):T135-56.
104. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol*. 2014;4(3):1201-28.
105. Schiffer L, Anderko S, Hannemann F, Eiden-Plach A, Bernhardt R. The CYP11B subfamily. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;151:38-51.

106. Yoshimoto FK, Auchus RJ. The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;151:52-65.
107. Arnold J. Ein Beitrag zur feineren Struktur und dem Chemismus der Nebennieren. *Archiv f pathol Anatomie von Virchow* 1866 35:64-107.
108. Gottschau M. Struktur und embryonale Entwicklung der Nebennieren bei Säugetieren. *Arch Anat Physiol Lpz.* 1883 9:412–58.
109. Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Allergy.* 1946;17(6):231; 89; 358.
110. Deane HW. The anatomy, chemistry, and physiology of adrenocortical tissue. *Handbuch der Experimentalle Pharmakologie* (Berlin: Springer). 1962;14:1–85.
111. Selye H, Jensen H. The chemistry of the hormones. *Annu Rev Biochem.* 1946;15:347-60.
112. Gross F. [Renin and hypertension, physiological or pathological agents?]. *Klin Wochenschr.* 1958;36(15):693-706.
113. Chester Jones I. *The Adrenal Cortex.* Cambridge: University Press. 1957.
114. Carpenter CC, Davis JO, Ayers CR. Relation of renin, angiotensin II, and experimental renal hypertension to aldosterone secretion. *J Clin Invest.* 1961;40:2026-42.
115. Novoselova T, King P, Guasti L, Metherell LA, Clark AJL, Chan LF. ACTH signalling and adrenal development: lessons from mouse models. *Endocr Connect.* 2019.
116. Drelon C, Berthon A, Mathieu M, Martinez A, Val P. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: A WNT perspective. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;408:156-64.
117. Drelon C, Berthon A, Sahut-Barnola I, Mathieu M, Dumontet T, Rodriguez S, et al. PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat Commun.* 2016;7:12751.
118. Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, Rosler A, White PC. Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyloxidase II deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(11):4996-5000.
119. Doghman M, Cazareth J, Lalli E. The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(8):3222-5.
120. Schwafertz C, Schinner S, Kuhn MC, Haase M, Asmus A, Mulders-Opgenoorth B, et al. Endothelial cells regulate beta-catenin activity in adrenocortical cells via secretion of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;441:108-15.
121. Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors.* 2005;23(2):111-6.

122. Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, et al. WNT/beta-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum Mol Genet.* 2014;23(4):889-905.
123. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, et al. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet.* 2010;19(8):1561-76.
124. Heikkila M, Peltoketo H, Leppaluoto J, Ilves M, Vuolteenaho O, Vainio S. Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology.* 2002;143(11):4358-65.
125. Kim AC, Reuter AL, Zubair M, Else T, Serecky K, Bingham NC, et al. Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development.* 2008;135(15):2593-602.
126. Walczak EM, Kuick R, Finco I, Bohin N, Hrycaj SM, Wellik DM, et al. Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol Endocrinol.* 2014;28(9):1471-86.
127. Finco I, Mohan DR, Hammer GD, Lerario AM. Regulation of stem and progenitor cells in the adrenal cortex. *Curr Opin Endocr Metab Res.* 2019;8:66-71.
128. Vinson GP. Functional Zonation of the Adult Mammalian Adrenal Cortex. *Front Neurosci.* 2016;10:238.
129. Pignatti E, Leng S, Carlone DL, Breault DT. Regulation of zonation and homeostasis in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;441:146-55.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1.1	Histologie der Nebenniere	08
1.2	Ursprung der Nebennierenanlage	11
1.3	Schema der Steroidbiosynthese	12
1.4	Lokalisation der Expression von P450 _{scc} , CYP17A1, CYP21A2, HSD3B2, CYP11B1 im Verlauf der Schwangerschaft	13
1.5	Graphisches Modell der Nebenniere	16
1.6	Graphik des Morphogengradienten nach der Hypothese von J. Hornsby	17
1.7	Graphik des Glucocorticoidgradienten, wie er in der Nebenniere vorliegt	18
1.8	Signalweg des Melanocortin-2-Rezeptors	19
1.9	Signalweg des Angiotensin-II-Rezeptors Typ 1	20
1.10	Wechselseitiger Einfluss der Sekretionsprodukte der Nebennierenrinde	22
2.1	Schema des Versuchsaufbaus	27
2.2	Versuchsaufbau in Realität	28
2.3	Versuchsaufbau mit gefärbtem Wasser	29
2.4	Prinzip der Auswertung	31
3.1.1	Relative Genexpression des Melanocortinrezeptor 2 (MC2R)	36
3.1.2	Relative Genexpression des Melanocortinrezeptor 2 (MC2R)	37
3.2.1	Relative Genexpression des Angiotensin-II-Rezeptor Typ1 (AGT1R)	38
3.2.2	Relative Genexpression des Angiotensin-II-Rezeptor Typ1 (AGT1R)	39
3.3.1	Relative Genexpression der Aldosteronsynthase (CYP11B2)	40
3.3.2	Relative Genexpression der Aldosteronsynthase (CYP11B2)	41
3.4.1	Relative Genexpression der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1)	42
3.4.2	Relative Genexpression der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1)	43
3.5.1	Relative Genexpression der 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17A1)	44
3.5.2	Relative Genexpression der 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17A1).	45
4.1	Übersicht über die hypothetische Ausrichtung der Gradienten, welche vermutlich die funktionelle Zonierung der Nebenniere regulieren	52
5.1.	Skizze des Glukokortikoidgradient und eines möglichen Endothelzellproduktgradient wie er in der Nebenniere vorliegen könnte	54

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
2.1	Übersicht über Interventionen	30
2.2	Pipettierschema für die Reaktionsansätze der qPCR	33
2.3	Programmeinstellung für die qPCR	33

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting Enzyme
ACTH	adrenocorticotropen Hormones
AT1R	Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1
ATCC	American Type Culture Collection
ATF-1	Activator- Transcription-Factor 1
ATF-2	Activator-Transcription-Factor 2
ATF2	Transcription-Factor 2
ATII	Angiotensin II
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration
CAMK	Calmodulinkinase
cAMP	3'5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-Binding-Protein
cDNA	komplementären DNA
CO ₂	Kohlendioxid
CREB	Cyclic-AMP-Response Element-Binding-Protein
CREM	Cyclic-AMP-Response-Element-Modulator
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CYP	Cytochrome P450
CYP11B1	11 β -Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
CYP17A1	17 α -Hydroxylase
CYP21A2	21-Hydroxylase
DAG	Diacylglycerin
DEX	Dexamethason
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECCM	Endothelzellkonditioniertes Medium
ECGF-a	Endothelial-Cell-Growth-Factor-A
ECGS	Endothelial-Cell-Growth-Supplement
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	Extracellular-Activated-Kinases
FGF1	Fibroblast-Growth-Factor
FSK	Forskolin
h	Stunde
HSD3B2	3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2
HUVEC	Humanen-Umbilikal-Venen-Endothel-Zellen
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IP3	Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat

LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
MC2R	Melanocortin-2-Rezeptor
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versucher
NBRE	Neuronal-Growth-Factor-Induced-Clone-B-Response-Element
NGFI-B	Neuronal-Growth-Factor-Induced-Clone-B
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
P450scc	Cholesterin-Desmolase
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pg	Pikogramm
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systeme
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SF1	Steroidogenic factor 1
SK	Schwellenkonzentration
sog.	sogenannt
SRC1	Steroid-Hormon-Rezeptor-Coaktivator-1
SSW	Schwangerschaftswoche
TCF	Transcription factor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
UpM	Umdrehungen pro Minute
vgl	Vergleich
VIP	vasoaktives-intestinale-Peptid
zF	Zona fasciculata
zG	Zona glomerulosa
ZKM	Zellkulturmedium
zR	Zona reticularis
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 01.07.2021

Felix Friedrich

11 Lebenslauf

Name	Felix Friedrich
Geburtsdatum/Geburtsort	11.08.1994 in Zwickau
Adresse	Hermannstraße 14, 08055 Rostock
E-Mail	felixfriedrich94@gmail.com

Bildungsweg

22.12.2020	Approbation als Arzt
07/2019 - 12/2020	Erfolgreiches Absolvieren des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung, praktisches Jahr und erfolgreiches Absolvieren des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
07/2018 - 07/2019	experimentelle Forschungsarbeit für die Sektion für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen der Universitätsmedizin Rostock
10/2015 - 07/2018	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock, klinischer Abschnitt
10/2013 - 10/2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock, vorklinischer Abschnitt, erfolgreiches Absolvieren des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
2005 - 2013	Peter-Breuer-Gymnasium Zwickau

Promotion

2016 - 2021	Transdifferenzierung von Nebennierenrindenzellen in Abhängigkeit von ihren physiologischen Stimuli und Sekretionsprodukten AG Molekulare Endokrinologie der Sektion für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen der Universitätsmedizin Rostock, Leiter: Prof. Dr. med. Holger S. Willenberg Note: magna cum laude
-------------	--

12 Thesen

1. NCI-H295R-Zellen sezernieren Stoffe, welche die Funktion benachbarter Zellen beeinflussen.
2. Durch einen kontinuierlichen Fluss von Zellkulturmedium über NCI-H295R-Zellen wird ein Gradient von Sekretionsprodukten aufgebaut, welcher ein räumliches Genexpressionsmuster bewirkt.
3. Wird eine bestimmte Fließgeschwindigkeit des Zellkulturmediums überschritten reicht die Sekretionsleistung der NCI-H295R-Zellen nicht mehr aus einen Konzentrationsgradient aufzubauen, sodass dieser ausgewaschen wird.
4. Glucocorticoide hemmen die Expression des Angiotensin-II-Rezeptor-Typ1 und erhöhen die Expression der 11 β -Hydroxylase.
5. Glucocorticoide induzieren die Expression sowohl der 11 β -Hydroxylase, als auch der Aldosteronsynthase und führen daher nicht alleine zu einer Differenzierung zwischen *Zona glomerulosa* und *Zona fasciculata*.
6. Die Expression von CYP11B2 wird neben dem AT1R-Signalweg maßgeblich durch andere Mechanismen reguliert.
7. Endothelzell-konditioniertes Medium induziert konzentrationsabhängig die Expression von CYP11B2 und inhibiert die Expression von CYP11B1, was durch β -Catenin vermittelt wird.
8. In der Nebenniere existiert, neben einem Konzentrationsgradient von Glucocorticoiden, ein Konzentrationsgradient aus Sekretionsprodukten von Endothelzellen, mit hoher Konzentration in der *Zona glomerulosa* und niedriger Konzentration in der *Zona fasciculata*, welcher die Differenzierung zwischen diesen beiden Zonen bewirkt.